

تغيرات سموم CagA في بكتريا *Helicobacter pylori* المعزولة من مرضى عراقيين

الهام عبد الهادي خلف¹، زهرة محمود الخفاجي¹، ناهي يوديف ياديين²، بسعد ناظم بسعدون³

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

2 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية / العراق

3 مستشفى الكاظمية التعليمي / بغداد / العراق

الخلاصة:

بكتريا *Helicobacter pylori* تسبب امراض الجهاز الهضمي وخاصة المعدة ، تتصف البكتريا بعدم ثبوتها الوراثي والذي ينعكس على عوامل ضراوتها وبالتالي تنوع الامراض التي تسببها . جمعت 210 خزعة نسيجية من مرضى عراقيين تم تحديد انواع مناطق فسفرة التايروسين في قطيقات (EPIYA) Motifs في سمومها والتي لها تأثير في مخرجات الاصابة وتم تحديد توالي هذه المناطق . أسفرت النتائج ان نوع EPIYA في المرضى العراقيين تعود الى النوع الغربي EPIYA-C. ووجد ان هناك تغيرات في هذه المنطقة (CagA 3') فقد سجلت حالات ABCCC وكذلك AC و BC . اظهرت مناطق القطيقات المساعدة (CagA multimerization) CM) المسئولة عن ازدواج جزئيات السم التي تعود بشكل رئيسي الى النوع الغربي وكانت بحدود 2 منها لكل جزئية ، وتبين ان بعض السلالات تحوي على قطيقات تختلف عن القطيقات الغربية والشرقية ولكنها موجودة في قواعد البيانات في العديد من سلالات *H. pylori* عند البحث عنها باستعمال برنامج BLAST.

الكلمات المفتاحية: *Helicobacter pylori* ، *Motifs EPIYA* ، *CagA multimerization*

المقدمة:

(4) وتكون البكتريا متباينة ومختلفة بشكل كبير بحيث تكاد لا توجد دراستين تتفق بخصوص البكتريا ، ويعود ذلك لحدوث تغيرات في جينوم البكتريا ويمكن ان توجد اكثر من سلالة في البيئة الواحدة مثل المعدة (6,7) ، وهي تتطور بشكل مرافق مع الانسان وتتأثر بالظروف البيئية المختلفة في المناطق الجغرافية المختلفة (4) ، وما يساعد في ذلك غياب نظام التصحيح (9,8) MMR ، كما انه لحد الان لم يسجل لها في قواعد البيانات التواليات الخاصة بـ Chi sites التي تثبت الجينومات في البكتريا الاخرى (10) ، فضلا عن حصول عمليات التآشب Recombination الشائعة (11) . وقد تبين ان عامل الضراوة CagA يحوي على مواقع خاصة يفسفر فيها التايروسين EPIYA الذي

Corresponding Address:

Elham A. Kalaf

**Genetic Engineering and Biotechnology Institute for
Post Graduate Studies / Baghdad University**

Email: elhamkalaf@yahoo.com

تعد بكتريا *Helicobacter pylori* من اهم مكونات المكونون الميكروبي في معدة الانسان Human gastric microbiome (1) وتوجد في اكثر من سكان المعمورة ، ويمكن ان تبقى بدون اعراض لعقود أو تكون السبب في عدد من الامراض التي تصيب الجهاز الهضمي وخاصة المعدة (2,3) ، وقد سجلت اصابات جديدة تصل الى 21,000 إصابة بسرطان المعدة وحدثت وفيات بالمرض الاخير تصل الى 10,470 في الولايات المتحدة (فقط) عام 2010 (4). تتباين ضراوة البكتريا اعتمادا على عوامل الضراوة التي تحويها واهمها السم CagA الذي يوجد في 50-60% من السلالات في الاقطار الغربية وترتفع النسبة الى 90% في الاقطار الشرقية ، ويزداد الخطر عند وجود هذا السم أي السلالات (4,5) CagA+ . والملاحظ ان خطورة الاصابة بالبكتريا تختلف من حيث المواقع الجغرافية ، والدراسات الخاصة اشارات الى ازدياد امراضيتها عند الهجرة من افريقيا الى شرق اسيا نتيجة لعمليات التطور

الخاصة بالمنطقة المتغايرة 3 CagA لناج تفاعل PCR بعد تنقيته من قبل شركة Eton Bioscience Inc.، USA باستعمال البوادي Cag2 ، Cag4 (دراسة تحت النشر .) ترجمت تواليات DNA الى الحوامض الامينية المقابلة باستعمال برنامج BLASTx.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blast_home . 23

اجري البحث عن قطيقات CMs مقابل قواعد البيانات العامة (nr) باستعمال برنامج BLASTp .

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blast_home

تم اجراء اصطفاقات Alignments للتواليات المحددة بأستعمال برنامج Bio Edit ver. 7.0.9/ ClustalW <http://www.BioEdit.ver.7.0.9/tools/clust-alw>

حددت ثملات التايروسين القابلة للفسفرة بأستعمال برنامج NetPhos 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> . اظهرت التراكيب المختلفة للبروتينات مثل الحلزونات Helixes وصفائح بيتا β -sheets واللفات Coils بأستعمال برنامج RaptorX <http://raptorx.uchicago.edu/predict>

النتائج:

عزلت 102 عينة DNA من بكتريا *Helicobacter pylori* من اصابات وامراض مختلفة (دراسة تحت النشر) . اختيرت 20 سلالة منها IRQ20-IRQ1 لتمثل اعمار مختلفة ، للرجال والنساء ، كما موضح في الجدول (1) ، لتحديد تواليات DNA فيها

يكون له دوراً مهماً في شدة امراضية السلالات (12،4). توجد قطيفة EPIYA ضمن تواليات مختلفة البعض يوجد في السلالات الغربية والآخر في الشرقية (12، 13) والتي تختلف في مخرجات اصابتها (14،2) وبذلك عد بروتين CagA كبروتين سرطان (15 Oncoprotein).

وتطور الدراسات وجد ان فسفرة CagA ليست هي المسؤولة فقط عن الامراضية وإنما هناك فعاليات كثيرة لجزئيات CagA التي حذفت منها مواقع الفسفرة (16) ، وان هناك حوالي 32% من العمليات التي يؤثر فيها CagA تحدث بدون فسفرة ، والاخيرة وجد انها تعتمد على قابلية السم لتكوين المزدوجات او التجمعات (CagA CM) multimerization بعد حقنه في الخلايا ، والمناطق المسؤولة عن ذلك تكاد تكون ثابتة في السلالات الغربية والشرقية ، وتتكون من 16 حامض اميني وان كل قطيفة EPIYA تمتلك CM خاص بها ، وقطيفات CM تساعد السم في فعاليتها بشكل غير معتمد على الفسفرة في الخلايا الطلائية (17) والتغير في توالي وتركيب CM يؤدي الى التغير في ضراوة البكتريا . وعلية فإن السم المفسفر له مسارات خاصة به وغير المفسفر له مسارات اخرى ونواتج تأثيرها مختلفة ولكن قد يكون الشكل غير المفسفر هو الاخطر لانه يقود الى حدوث سرطان المعدة بتداخله مع مكونات خاصة مثل- β Catenin وغيرها من البروتينات في مسارات مختلفة تؤدي في النهاية الى تنشيط جينات السرطان (18،16) ، ويمكن للتداخل ان يحث الاستماتة Apoptosis أو كبحها اعتمادا على فسفرة السم (19،20). وعلى العموم فان السم CagA يعد من اكثر عوامل الضراوة ارتباطاً من حيث العدد من مكونات الخلايا في عالم الاحياء المجهرية (21) ، وتعتمد استنتاجات الباحثين على الموديلات الدراسية المستعملة (22،16) . والدراسة الحالية تناولت بعض الجوانب المذكورة اعلاه في السلالات المعزولة من مرضى عراقيين في مدينة بغداد .

المواد وطرائق العمل:

تم جمع 210 عينة من خزع المعدة Stomach biopsy من فئات عمرية تراوحت بين (72-15) عاماً بمعدل عمر (16 ±44.4) ، تضمنت 97 عينة من الذكور و 113 عينة من الإناث مصابين بالتهاب أو قرحة المعدة ، قرحة الاثنى عشر وسرطان المعدة . جمعت العينات من موقعين لمدينة بغداد / شعبة الناظور في مستشفى الكاظمية التعليمي ومستشفى اليرموك للمدة من شهر حزيران 2010 ولغاية آب 2011 . تم استخلاص 102 عينة DNA موجبة لبكتريا *Helicobacter pylori* ، حددت تواليات المناطق

جدول (1) : السلالات التي تم تحديد تواليات النهاية 3' لسم CagA

رقم السلالة	الجنس	العمر (سنة)	التشخيص المرضي
IRQ 1- 80	ذكر	37	Gastritis
IRQ 2- 50	ذكر	43	GU
IRQ 3- H1	انثى	46	DU
IRQ 4- H6	ذكر	35	Gastritis
IRQ 5- 103	انثى	22	Gastritis
IRQ 6- 74	انثى	45	GU
IRQ 7- 101	ذكر	51	DU
IRQ 8- 17	انثى	45	DU
IRQ 9- 90	ذكر	48	DU
IRQ 10- 102	ذكر	39	Gastritis
IRQ 11- 66	ذكر	45	Gastritis
IRQ 12- 181	ذكر	50	DU
IRQ 13- 10	انثى	46	DU
IRQ 14- 129	ذكر	57	GU
IRQ 15- 11	ذكر	48	GU
IRQ 16- 18	انثى	52	GC
IRQ 17- 71	انثى	40	Gastritis
IRQ 18- 175	انثى	58	GU
IRQ 19- 106	ذكر	44	DU
IRQ 20- 85	ذكر	42	GC

GU قرحة معدية
DU قرحة الاثني عشر
GC سرطان المعدة

تلتها حالة الالتهابات 30% (6/20) والتي تمثل بدايات الاصابة بالبكتريا ومنطلقا للتطور الى امراض اخرى ، ثم تلتها قرحة المعدة 25% (5/20) وكانت اقل النسب هي لحالة سرطان المعدة 10% (2/20) . وما لاشك فيه ان سم CagA يؤدي الى حدوث تغيرات في الخلايا الطلائية بعد حقنه ، وداخل الخلية يفسفر عند ثمالات التايروسين

يتضح من الجدول ان المدى العمري للمرضى امتد من 22-58 سنة وان ليس هناك فرق في الاصابات عند الاخذ بنظر الاعتبار الجنس . مثلت العينة التي اخضعت للدراسة (عينة صغيرة نوعا ما) لتشمل اغلب الامراض الناتجة من الاصابة ببكتريا H. pylori ، وكانت في المرضى العراقية اعلى نسبة هي الاصابة بقرحة الاثني عشر 35% (7/20)

بعض عوامل أخرى آتية من جزيئات السم غير المفسر (3)، (12)، وبالتالي لوحظ أن ثلث جينات الخلايا الطلائية تعاني من اضطرابات في التعبير عنها بغض النظر عن حالة فسفرة السم (16، 17، 24). ويتضح من هذا أن مواقع الفسفرة يكون لها التأثير الكبير وكذلك تؤثر في مواقع ارتباط السم داخل الخلايا والذي عندها يمارس فعاليات مختلفة (16)، (25). وظهرت نتائج تحديد تواليات قطع CagA، أن السلالات العراقية تحوي على قطبيات EPIYA الغربية، وبمكررات مختلفة كما موضح في الجدول (2) وشكل (1)

ضمن قطبيات EPIYA بواسطة عائلة الكاينيزات الخلووية Src/Abl، ولكن ليس كل جزيئات السم المحقونة تعاني من الفسفرة، إذ أن البعض يبقى بدون فسفرة وأخرى تزال منها مجموعة الفوسفات، وكل هذه الجزيئات تبدأ بالتداخل مع مكونات مختلفة لتعطي مخرجات مختلفة لا مراضية هذه البكتريا (17)). وهناك مواقع خاصة للفسفرة إذ أن ليس كل التايروسين ضمن قطبيات EPIYA يعاني من الفسفرة، وعلى العموم فإن الجزيئات المفسفرة تتداخل مع دومينات SHP2 لتكون المعقدات التي تؤثر في نقل الإشارات، كما أن تحفيز هذه المعقدات هي الأخرى تتأثر

جدول 2: تفاصيل وجود EPIYA وأنواعها في سموم CagA في السلالات العراقية

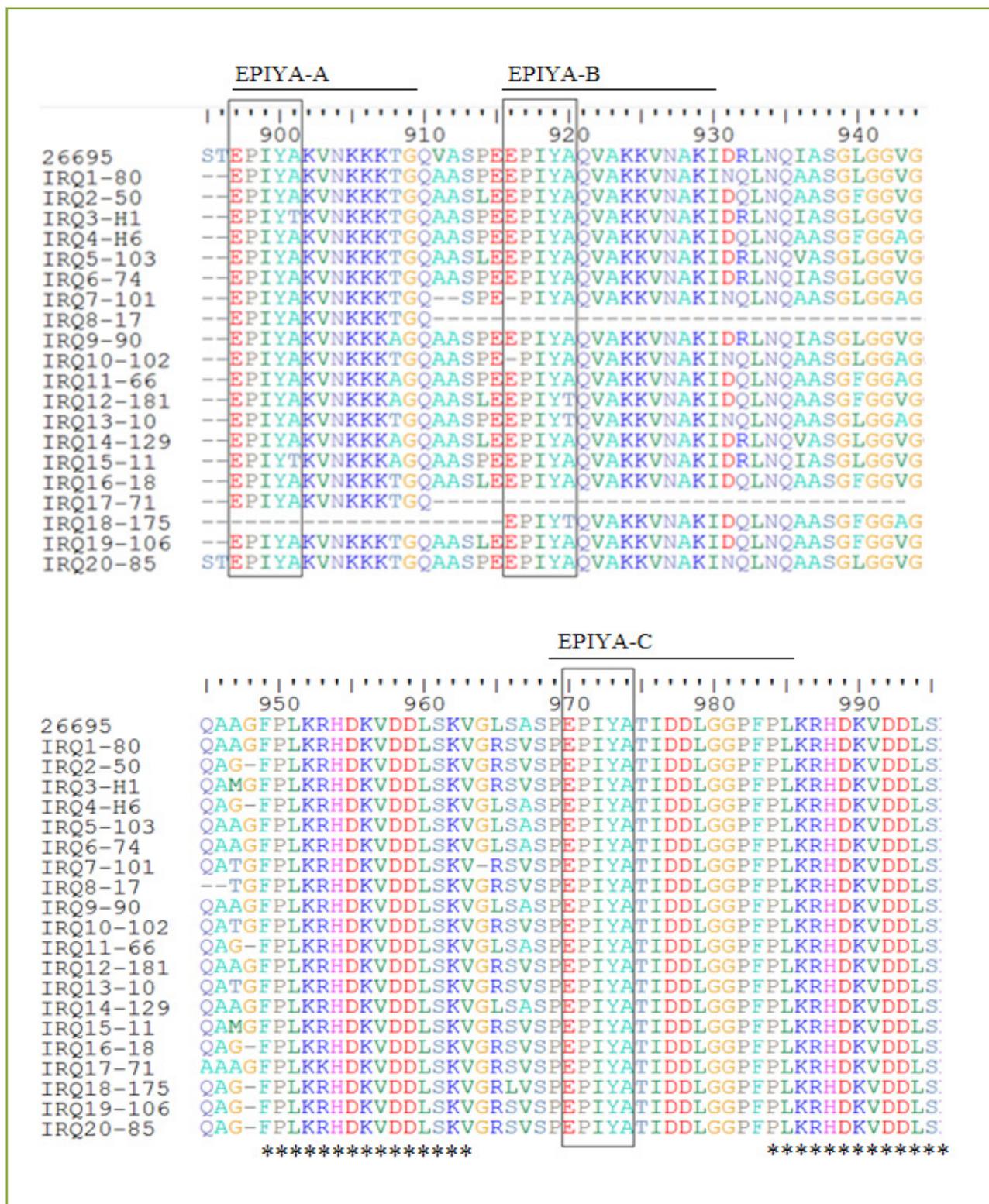
رمز السلالة	طول DNA (قاعدة)	نوع EPIYA	عدد EPIYA	ملاحظات أخرى
IRQ 1- 80	618	ABC	3	
IRQ 2- 50	618	ABC	3	
IRQ 3- H1	621	ABC	2	A (EPIYT)
IRQ 4- H6	620	ABC	3	
IRQ 5- 103	625	ABC	3	
IRQ 6- 74	640	ABC	3	
IRQ 7- 101	618	ABC	2	
IRQ 8- 17	526	AC	2	
IRQ 9- 90	607	ABC	3	
IRQ 10- 102	619	ABC	3	
IRQ 11- 66	618	ABC	3	
IRQ 12- 181	621	ABC	1	B(EPIYT)
IRQ 13- 10	626	ABC	2	B(EPIYT)
IRQ 14- 129	622	ABC	2	
IRQ 15- 11	618	ABC	2	A (EPIYT)
IRQ 16- 18	610	ABC	3	
IRQ 17- 71	510	AC	2	
IRQ 18- 175	539	BC	1	B (EPIYT)
IRQ 19- 106	623	ABC	3	
IRQ 20- 85	869	ABCCC	5	

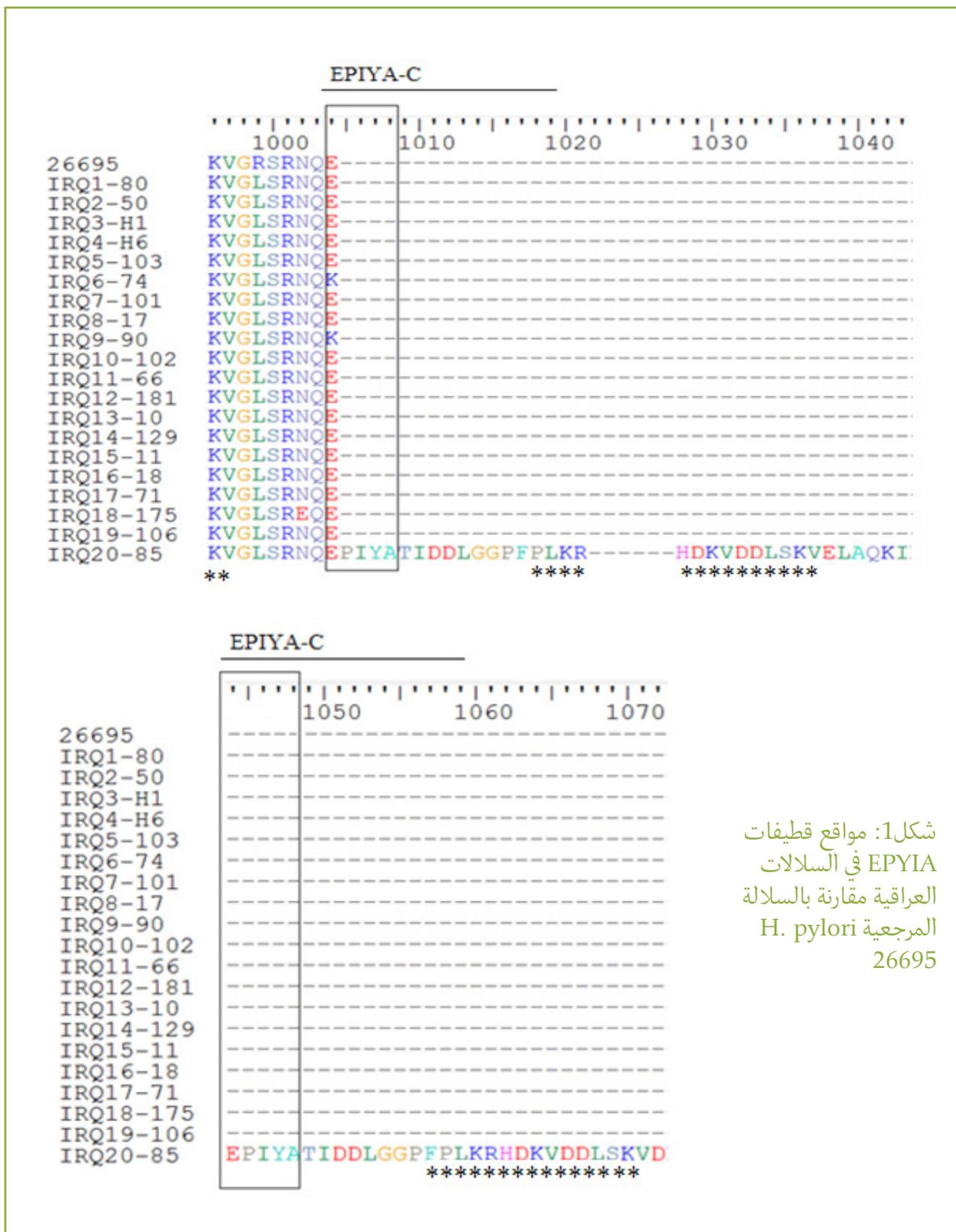
من فسفرة CagA وبالتالي زيادة فعاليته، ومن الجدير بالذكر أن القطبيات في الموقع الثاني أي C أو D هي التي تتداخل مع (2، 4) SHP2 ويكون تداخل وفعالية D أقوى وتكون أكثر الفة لذلك فوجود واحدة منها يمكن أن يؤدي المستوى المطلوب والذي يعوض في السلالات الغربية بتكرار C، وللحواض الامينية المحيطة بهذه القطبيات التأثير الأكبر (2، 4، 24، 27). أن مفهوم تقسيم السلالات الى غربية وشرقية قد لا

وقد تراوح طول القطع من النيوكلووتيدات بين 510 قاعدة (السلالة IRQ17-71) تمثل اقصر توالي مسجل الى 869 قاعدة (السلالة IRQ20-85) لتمثل أطول توالي. وبعد ترجمة هذه التواليات باستعمال البرنامج Blastx وتمثيلها في الشكل (1)، يلاحظ أن نوعية EPI-YA تعود الى نوع السلالات الغربية Western strains (26)). وقد أشارت الدراسات الى أن الأنماط الغربية تكون أقل ضراوة مالم يتم تكرار القطيفة (C) فيها لتزيد

western CagA subtype ويعتقد انها حلقة الوصل بين الغربية والشرقية التي ظهرت اثناء الهجرة ، في حين ان السلالات الغربية لم يكتشف لحد الان وجود سلالات شرقية فيها وربما اشارت هذه الى اتجاه الهجرة (28، 29) .

يكون واضحا في بعض الاحيان فقد وجدت اختلافات في السلالات العراقية كما موضح في الجدول (2) ، فضلا عن ان بعض السلالات المعزولة من منطقة Okinawa تمتلك EPIYA-C وهي من السلالات الشرقية ومع هذا لا تتعقد (Clustering مع السلالات الغربية لذلك سميت J-





شكل 1: مواقع قطيقات EPIYA في السلالات العراقية مقارنة بالسلالة المرجعية H. pylori 26695

ويظهر مواقعها ولكن في هذه الحالة لا يمكن الاعتماد على هذه النتائج .

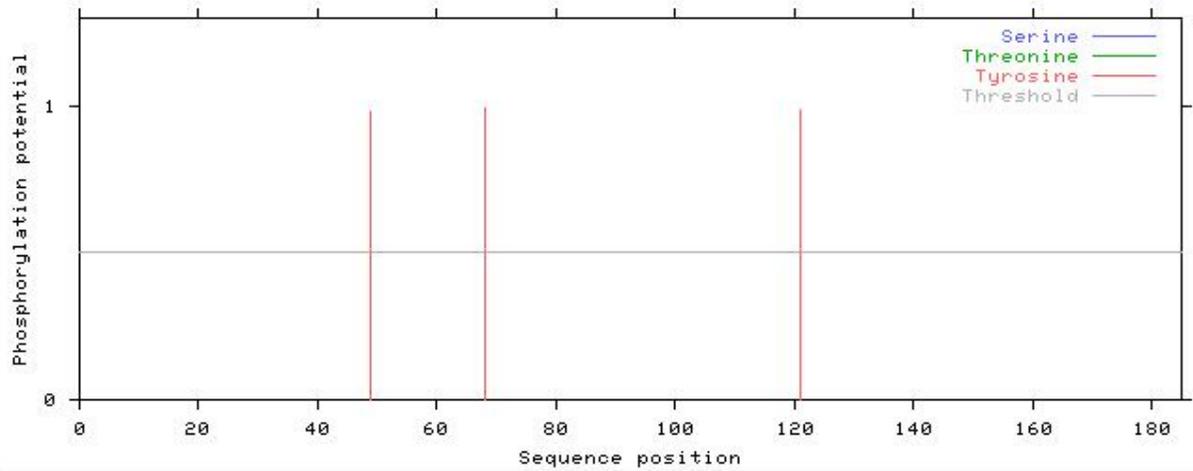
درست مواقع الفسفرة لقطيقات EPIYA باستعمال البرنامج NetPhos 2.0 . يظهر البرنامج مواقع فسفرة التايروسين في قطيقات EPIYA كما موضح في الشكل 2،

Phosphorylation sites predicted: Tyr: 3

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
IRQ1-80	49	TEPIYAKVN v	0.983	*Y*
IRQ1-80	68	EEPIYAQVA	0.992	*Y*
IRQ1-80	121	PEPIYATID ^	0.986	*Y*

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in IRQ1-80



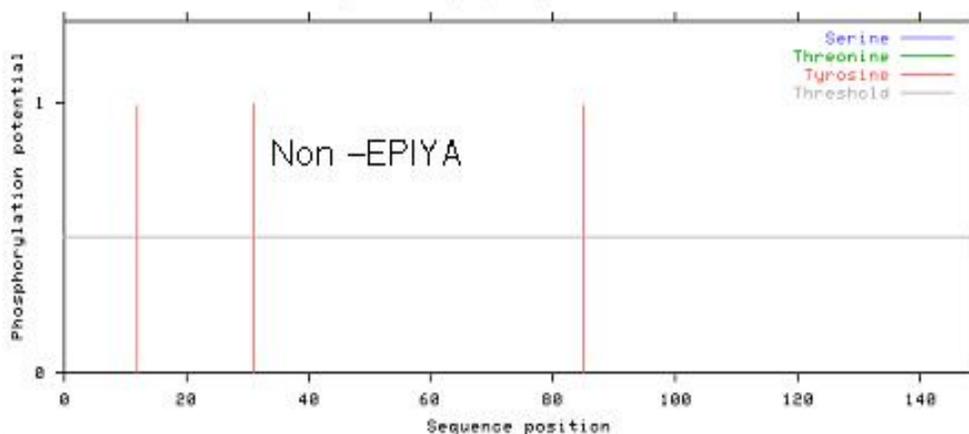
شكل 2 : مواقع فسفرة التايروسين بأستعمال برنامج NetPhos 2.0 في قطيقات EPIYA

Phosphorylation sites predicted: Tyr: 3

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
IRQ12-181KN	12	NEPIYAKVN	0.988	*Y*
IRQ12-181KN	31	EEPIYTQVA	0.992	*Y*
IRQ12-181KN	85	PEPIYATID	0.986	*Y*

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in IRQ12-181KN

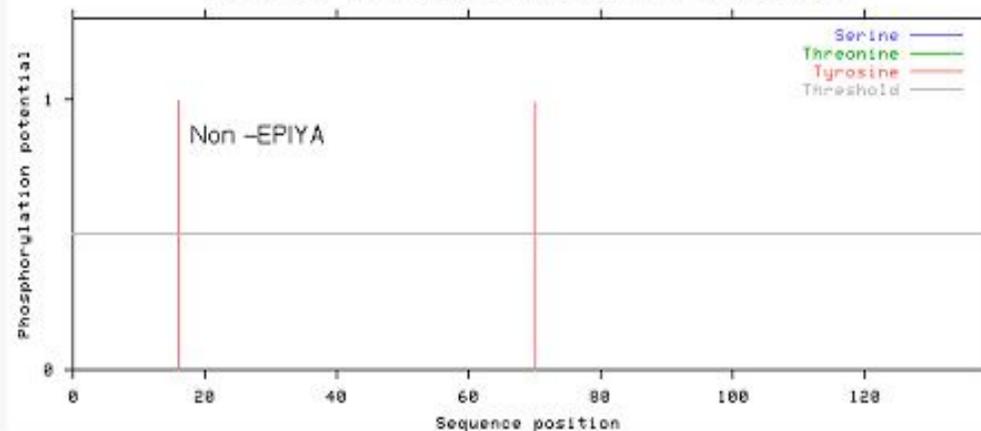


Phosphorylation sites predicted: Tyr: 2

Tyrosine predictions

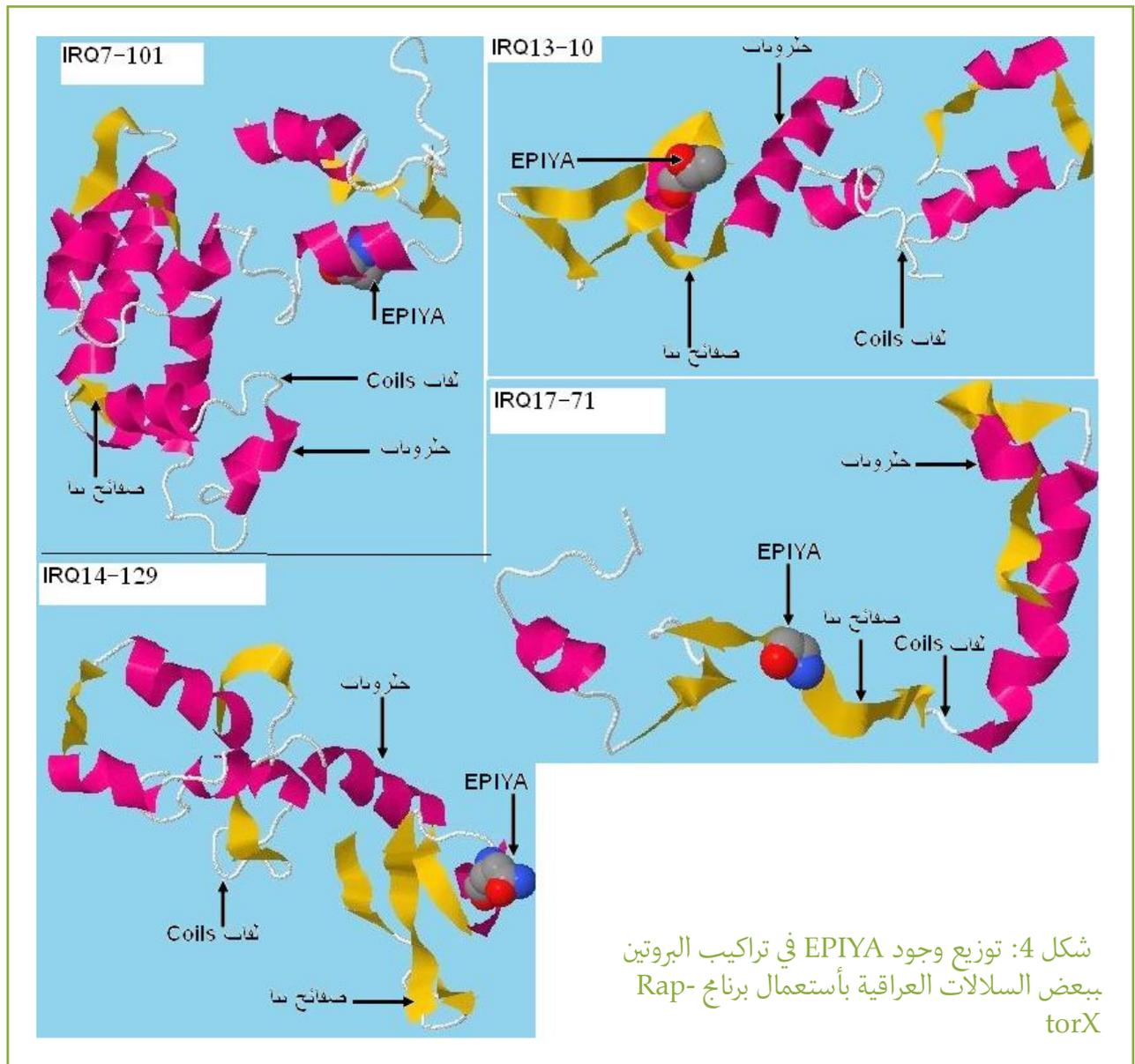
Name	Pos	Context	Score	Pred
IRQ13-10GTL	16	EEPIYTQVA	0.992	*Y*
IRQ13-10GTL	70	PEPIYATID	0.986	*Y*

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in IRQ13-10GTL



شكل ٣:
مواقع فسفرة
التايروسين
بأستعمال برنامج
٢,٠ NetPhos
في مواقع مختلفة

ولتوضيح صورة EPIYA ومواقعها استعمال برنامج RaptorX ولم تعط النتائج صورة واضحة حول ضراوة السلالات ، اذ توزع وجود EPIYA في حلزونات البروتين Helixes واخرى في صفائح بتا β -sheet ، اخرى وقعت في مناطق التقاء تركيب الحلزون مع الصفائح أو قرب اللفات Coils للبروتين كما موضح بعضها في الشكل (4)



وتبين من النتائج اعلاه ووفقا لما ذكر أنفا ان EPIYA في سم CagA لا تمثل الصورة المتكاملة حول فعالية هذا السم الذي يجد العديد من المكونات الخلوية التي يمكن ان يتداخل معها ويؤدي الى المزيد من الحالات المرضية (21) وظهرت بعض هذه الفعاليات باكتشاف تواليات CagA

تم التحري عن CM 16، 30 (multimerization motifs) . تم في سموم السلالات العراقية كما موضح في الشكل (5) .

>gi|2313664| AAD07614.1| cag pathogenicity island protein (cagA) [Helicobacter pylori 26695]

MTNETIDQTRTPDQTSQTAFDPQQFINNLQVAFIKVDNVVASFDPDQKPIVD-
 KNDRDNRQAFDGLISQLREEYSNKAIKNPTKKNQYFSDFDKSNLINKDNLID-
 VESSTKSFQKFGDQRYQIFTSWVSHQKDPKINTRSIRNFMENIIQPPIPDDKEKAE-
 FLKSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVFDES�KERQEA EKNGGPTGGDWLDIFLS-
 FIFNKKQSSDVKEAINQEPVPHVQPDIATTTTIDIQGLPPEARDLLDERGNFSKFTL-
 GDMEMLDVEGVADIDPNYKFNQLLIHNNALSSVLMGSHNGIEPEKVSLLYAGNG-
 GFGDKHDWNATVGYKDQQGNNVATLINVHMKNNGSGLVIAGGEKGINNPSFY-
 LYKEDQLTGSQRALSQEEIRNKVDFMEFLAQNNTKLDNLSEKEKEKEKFQNEIED-
 FQKDSKAYLDALGNDRIAFVSKKDTKHSALITEFNNGDLSYTLKDYGKKADKAL-
 DREKNVTLQGSLKHGVMFVDYSNFKYTNASKNPNKGVGATNGVSHLEAGF-
 NKVAVFNLPDLNLAITSFVRRNLENKLTAKGLSLQEANKLIKDFLSSNKELAG-
 KALNFNKAVAEAKSTGNYDEVKKAQKDLEKSLRKREHLEKEVEKKLESKSGNKNK-
 MEAKAQANSQKDEIFALINKEANRDARAIAYTQNLKGIKRELSKLEKISKDLKDF-
 SKSFDEFKNGKKNKDFSKAEETLKALKGSVKDLGINPEWISKVENLNAALNEFKNG-
 KNKDFSKVTQAKSDLENSVKDVIINQKVTDKVDNLNQAVSVAKAMGDFSRVEQV-
 LADLKNFSKEQLAQQAQKNEDFNTGKNSELYQSVKNSVNKTLVGNGLSGIEAT-
 ALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNNGLKNSTEPYAKVNKKKTGQVASPEEPI-
 YAQVAKKVNAKIDRLNQIASGLGGVGQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGLSASPEPI-
 YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGRSRNQELAQKIDNLNQAVSEAKAGFF-
 GNLEQTIDKLDSTKKNVMNLYVESAKKVPASLSAKLDNYAINSHTRINSNIQN-
 GAINEKATGMLTQKNPEWLKLVNDKIVAHNVGSVLSSEYDKIGFNQKNMKDYS-
 DSKFSTKLNNAVKDIKSGFTHFLANAFSTGYCLARENAEHGIKNVNTKGGFQKS

IRQ1-80

TLVGNGLSQAEATTL SKNFSDIKKELEAKLGNFnnnnnnnglknSTEPYAKVNKKKT-
 GQAASPEEPIYAQVAKKVNAKINQLNQAAASGLGGVGQAAGFPLKRHDKVDDL-
 SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELAQKIDNLNQAV-
 VSEAKAGFFGNLEQTID

IRQ2-50

SQAEATTL SKNFSDIKKELNAKLGNfnnnnnnnglknEPIYAKVNKKKTGQAASLEEPI-
 YAQVAKKVNAKIDQLNQAAASGFGGVGQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPI-
 YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELAQKIDNLNQAVSEAKAGFFGNLE-
 QTIDK

IRQ3-H1

SQAEATTL SKNFSDIKKELNAKLGNfnnnnnnnglknEPIYTKVNKKKTGQAASPEEPI-
 YAQVAKKVNAKIDRLNQIASGLGGVGQAMGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPI-
 YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELAQKIDNLNQAVSEAKAGFFGNLE-
 QTIDNSK

IRQ4-H6

YQSVKNSVNGTLVGNGLSQAEATTL SKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNNNNGLKNEPI-
 YAKVNKKKAGQAASPEEPIYAQVAKKVNAKIDRLNQVASGLGGVGQAAGFPLKRH-
 DKVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELAQKIDN-
 LNQAVSEAKAGFFGNLEQTID

IRQ5-103

DGLKENEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNNNGLNSTEPIYAKVNKKKTGQA-
ASLEEPIYAQVAKKVNAKIDRLNQVASGLGGVQQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGL-
SASPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN LNQAVSEAK-
AGFFGNLEQTIDNSKD

IRQ6-74

EKSEIYQSVKNGVNVTLVGNGLSKADATDLAKKFS DIKkELNEKLKNF-
NNNNNNGLKNEPIYAKVNKKKTGQAASPEEPIYAQVAKKVNAKIDRLNQIASGLG-
GVGQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGLSASPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL-
SKVGLSRNQKLAQKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLEQTIAFTKRS

IRQ7-101

TLVGNGLSAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNNNGLKNEPIYAKVNKKKT-
GQASPNQAASGLGGAGQATG **FPLKRHDKVDDL SKVRS**VSPEPIYATIDDLGGPF-
PLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLEQTIDNFQ

IRQ8-17

AGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRN-
QELA QKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLEQTIDNFKDS

IRQ9-90

SELYQSVKNGVNVTLVGNGLSKADATDLAKKFS DIKkELNEKLKNF-
NNNNNNGLKNEPIYAKVNKKKAGQAASPEEPIYAQVAKKVNAKIDRLNQIASGLG-
GVGQAAGFPLKRHDKVDDL SKVGLSASPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL-
SKVGLSRNQKLAQKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLEQTID

IRQ10-102

SSALYQSVKngvngtlvgnglSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNNNGLKNEPI-
YAKVNKKKTGQAASPEPIYAQVAKKVNAKINQLNQAASGLGGAGQATGFPLKRHD-
KVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN-
NQAVSEAKAGFFGNLEQTID

IRQ11-66

ENSALYQSVKNGVNGTLVGNGLSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNF-
NNNNNNGLKNEPIYAKVNKKKAGQAASPEEPIYAQVAKKVNAKIDQLNQAAS-
GFGGAGQAGFPLKRHDKVDDL SKVGLSASPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL-
SKVGLSRNQELA QKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLEQTIDSL

IRQ12-181

KNSELYQSVKngvngilvgnglSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNI nnnnnnglknEPI-
YAKVNKKKAGQAASLEEPIYTQVAKKVNAKIDQLNQAASGFGGVGQAAGFPLKRH-
DKVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN-
LNRAVLEAKAHHFDNLDQTID

IRQ13-10L

GTLVGNGLSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFnnnnnnnglknEPIYAKVNKKKTGQA-
ASPEEPIYTQVAKKVNAKINQLNQAasglggagqatgFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPI-
YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN LNQAVSEAKAGFFGNLE-
QTIDKFKD

IRQ14-129

GTLVGNGLSKAEATTLSKNFSDIKKELNAKLGNFnnnnnnnglknEPIYAKVNKKKTGQA-

ASPEEPIYTQVAKKVNKINQLNQaasglggagqatgFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPI-
YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDNLNQAVSEAKAGFFGNLE-
QTIDKFKD

IRQ15-11

ENLELYQSVMKngvngtlvgnglSQA EATTLSKNFSDIKKELNAKLG NfnnnnnnglknEPIYT-
KVNKKKAGQAASPEEPIYAQVAKKVNKIDRLNQIASGLGGVGVQAMGFPLKRHD-
KVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDNL-
NQAVSEAKAGFFGNLEQTIDNPK

IRQ16-18

KNGVNGTIYQVEKKVNGLSQA EATTLSKNFSDIKKELNAKLG NfnnnnnnglknEPI-
YAKVNKKKTGQAASLEEPIYAQVAKKVNKIDQLNQ AASGFGGVGVQAGFPLKRHD-
KVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDN

IRQ17-71

LSPNFTDIKKELNAKLG NfnnnnnnglknEPIYAKVNKKKTGQAAGFPLKHKHDKVDDL-
SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDNLNQAV-
VSEAKAGFFGNLEQTIDNFKD

IRQ18-175

LSKNFSDIKKELNAKLG NlnnnnnnglenSTEPIYTQVAKKVNKIDQLNQ AAsfgg-
gagqagFPLKRHDKVDDL SKVGRVLSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGL-
SREQELKQNIDNLEAKACHFDNLDQTIDNLQR

IRQ19-106

QSVKNGLKT LVGNGLSQA EATTLSKNFSDIKKELNAKLG NFNNNNNNGLKNEPI-
YAKVNKKKTGQAASLEEPIYAQVAKKVNKIDQLNQ AASGFGGVGVQAGFPLKRHD-
KVDDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQELA QKIDNL-
NQAVSEAKAGFFGNLEQTIDNFQ

IRQ20-85

IEKKDPKNLSKKVSDIKKELEAKLG NfnnnnnnglknSTEPIYAKVNKKKTGQAASPEEPI-
YAQVAKKVNKINQLNQ AASGLGGVGVQAGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSPEPI-
YATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL-
SKVELAQKIEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVDNLNQAVSEAKAGFFGNLE-
QTIDNFK

شكل 5 : أنواع قطيفات CMs (المناطق الغامقة) في السلالات العراقية مقارنة بالسلالة المرجعية H. pylori 26695

الى حوالي 70% (11 ثمالة من 16) (2) ولكن فيما بعد وجد ان السلالات قد تكون متباينة بالنسبة CM فالبعض يحوي على W/W أي اثنين من القطيفات الغربية وهذه وجد لها الفة عالية وتأثير في المعقد SHP2 /CagA مقارنة بالسلالات الحاوية على (30، 3) (E/W) ، وكل تغاير يحصل في CM يؤدي الى اضطراب مخرجات الاصابة (31) ، ولكن تبين فيما بعد ان توالي مكون من 16 حامض اميني لا يمكن ان يكون ثابتا في بكتريا مثل H. pylori المتغيرة والمتباينة بشكل كبير جدا ، فقد وجدت تواليات مختلفة

ويشير الشكل الى ان السلالة المرجعية (26695) تحوي على اثنين من التوالي المتفق عليها والمكون من 16 حامض اميني (3، 17) ، الاولى CM1 تقع في الموقع 963-948 والثانية CM2 في الموقع 997-982 وقد اتفق على ان التوالي الخاص بـ CM مكون من الاحماض الامينية (30) (PLXRXXXVXDL SKVG) ، وان السلالات الغربية تحوي على CM-W التي تختلف عن القطيفات في السلالات الشرقية (3) (CM-E) ، وافترض انها تكون تواليات ثابتة ، ونسبة التشابه بين الشرقية والغربية يصل

يشير الى وجود مسارات اخرى غير معتمدة على الفسفرة (ومنها وجود 3 CM) ، وتشير التوجهات الدراسية العامة الى ان زيادة حدوث اسوأ حالات الامراضية وهي السرطان يعتمد ولو بشكل قليل على زيادة اعداد النوع (C) او وجود القطيفة (31،24 (D) . وقد ذكر ان السلالات التي فيها عدد اكبر من EPIYA تكون اقل مقاومة لحموضة المعدة (13) وهذا يعني ان البكتريا التي فيها عدد اكبر من EPIYA يمكن ان تعيش عند وجود Advanced atro-phic gastritis كما في حالة سرطان المعدة الذي يكون ييه افراز الحامض قليل وهذا وان كان صحيحا فان EPI-YA المتعددة يمكن ان تكون قد تطورت بعد بدأ الضمور Atrophy وهي ليست السبب وانما هي متأثرة بهذا الضمور (4 ، 13) .

وما ذكر اعلاه ان الفسفرة للسم لا تمثل كل الجوانب فهناك CM التي يكون لوجودها تأثير في المعقدات الناتجة من فسفرة CagA مع SHP2 ، فضلا عن انها تتداخل مع مكونات خلوية مؤدية الى احداث الاضطراب فيها الذي يظهر على شكل حالات مرضية (2 ، 16 ، 17) . ومن اهم تداخلات CM هو مع Catenin وغيرها مما يؤدي الى تجميع Catenin في نواة الخلية وبذا يشجع التعبير عن جينات السرطان . فضلا عن ان تداخل CM يمكن ان يؤدي الى منع الاستماتة (16 ، 34 Apoptosis) . وقد اشير الى ان وجود اثنين من CM-W ربما يكون من اقل المتطلبات لضراوة CagA لتكوين المعقدات الخاصة ببحث السرطان (2) . وقد لوحظ ان الطفرة الخالية من EPIYA المعرضة للفسفرة لها القابلية على تحفيز β -Catenin و NF- κ B مما يشير الى ان فعالية CM تختلف عن قطيفة EPIYA وحالة فسفرتها (17) ، لان الضراوة قد تكون على اقصاها دون المرور بارتباط CagA ب SHP2 ، ففي شرق اسيا تكون اغلب السلالات CagA+ بغض النظر عن شدة المرض ويصعب تفسير معظم الحالات (على الاقل في الوقت الحاضر) بأعتماد وجود أو غياب CagA (35) ، دراسة تحت النشر) . وهذا يعود الى جوانب وعوامل مختلفة فمثلا قطبية الخلايا الطلائية وفعاليتها المتعددة ووجود المثبطات التي تحافظ على قطبية الخلايا تلعب دورا مهما في تحويل الخلايا الطلائية الى خلايا ورمية (2) . فضلا عن تعدد الاهداف والمسارات التي يستخدمها CagA سواء في حالة الفسفرة أو بدون فسفرة ، كما في تدخل CM التي تؤثر في قوة فعالية CagA والتي ترشحها أن تكون اهداف دوائية لتجنب ما يترتب عن استعمال المضادات الحيوية وما ينتج عن الاصابة المزمنة (17) .

وما يشير اليه تعقد الاصابة بهذه البكتريا هو وجود عوامل ضراوة اخرى قد تكون مسؤولة عن زيادة الضراوة في بعض المناطق ، فضلا عن تداخل العوامل الخاصة بالمضيف وخاصة الوراثة منها ، فالتغيرات الموجودة في الجينات المسيطرة عن الاستجابات الالتهابية يمكن ان تشجع

تحوي على قطيفات CM التي تبدلت فيها المتغيرات (X) في التوالي اعلاه. (3)

مثل I - FPLRRSAAVEDLSKVG ، II- FPLRRSAKVEDLSKVG ، III- FPLRRSAKVD-DLSKVG

اما في السلالات العراقية فقد وجد ان الاغلبية العظمى تحوي على اثنين من CM-W كما موضح في الشكل 5 ، فضلا عن تسجيل تواليات مكونة من 16 حامض اميني (كقاعدة محددة لطول CM) ، تختلف وتشد عن التوالي المفترض للـ CM والمذكور اعلاه وهي الموضحة في الشكل (5) للسلالة 101-7-IRQ ، وكذلك في السلالة 17-IRQ (71 ووجود اكثر من نوع جديد (اثنين) في السلالة 17-IRQ 71-20-85 فضلا عن احتوائها على 2 من CMs التقليدية (CMs W-) وهذا يتفق مع مسجل من تغيرات في هذه الحالة. فقواعد البيانات العامة تحوي على اثنين من E-CM المحورة وبأرقام تسجيل EF 552413. EF 552412: Acc.No معزولة من منطقة في المكسيك (32) ، وكذلك الجزئية برقم تسجيل AB090083 تحوي على قطيفة غربية CM-W واخرى شرقية (2) ومثل هذا التغير المعقد للـ CagA مهم اثناء تطور جين CagA ، ولذا يتوقع ان يكون هناك تغيرات اخرى في انتظار اكتشافها .

وقد تم صف التواليات التي وجدت في السلالات العراقية باستعمال البرنامج BLASTP مقابل القاعدة nr ووجد انها منتشرة في سلالات كثيرة من H. pylori دون ان توثق ببحوث.

المناقشة:

ان دراسة العلاقة بين التنوع التركيبي وضراوة CagA تكون مهمة لحديث مخرجات الاصابة خاصة بالسلالات CagA+ ، وهذه يجب ان تكون على اسس كمية ونوعية نظرا لاختلاف السلالات في ضراوتها (2) ، وقد اتخذ ارتباط CagA ب SHP2 كأساس لتحديد الضراوة وهذا غير صحيح لان الضراوة قد تكون على اقصاها دون المرور بهذا الخط من التفاعلات ، ولذلك يلاحظ ان ضراوة السلالات لا تكون ذات صلة وثيقة جدا مع فسفرة السم اذ ان بعض السلالات لا تحوي سمومها على EPIYA تؤدي الى توليد السرطانات التي تعد اكثر امراضية شدة عند الاصابة بالبكتريا (17) ، كما اظهرت دراسة الحاسوب In Silico ان العلاقة تكون عكسية وان معامل الارتباط يكون سالبا بين عدد حالات حدوث السرطانات وعدد قطيفات EPI-YA في السموم (دراسة تحت النشر) .

ان السموم الخالية من (C) (السلالات الغربية) يمكن ان تولد السرطانات وان كانت قليلة (33) ، ولكن تكون من المتطلبات الاساسية لحث الامراض بواسطة CagA والذي

أمكنية الإصابة بالبكتريا. وتلعب ظروف أخرى في الموضوع مثل نمط الحياة، وقلة تناول الخضروات والفواكه الطازجة، وزيادة تناول الملح والتترات في الاغذية كلها تؤدي الى زيادة مخرجات الإصابة وتنوعها (4)

أو توهن الاستجابة الالتهابية وبالتالي تطور الجوانب السلبية عند الإصابة (4). كما ان مدة الإصابة والعمر عند الإصابة تلعب دورا مهم في الاعراض أو الامراض التي تظهر، كذلك ان سوء التغذية عند الطفولة أو الإصابة في الاعمار المبكرة التي تؤدي الى قلة افراز الحامض في المعدة والزيادة في

References:

- Polk, D. and Peek, R. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, 10: 403-414.
- Lu, H., Saito, Y., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Zhang, H., Higashi, H. and Hatakeyama, M. (2008). Structural and functional diversity in the PARI6/MARK2 - binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.*, 99: 2004-2011.
- Sicinschi, L., Corvea, P., Peek, R., Camargo, M., Piazzuelo, M. and Romero - Gallo, J. (2010). CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian Patients with gastric precancerous lesions. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 369-378.
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 629 – 641.
- Hatakeyama, M. and Higashi, H. (2005) *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 96: 835-843
- Bik, E., Ec- Kburg, P., Gill, S., Nelson, K., Purdom, E. and Francosis, F. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103: 732-737.
- Dover, M., Talaico, S. and Salama, N. (2009). *Helicobacter pylori* unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.* 5:e1000544.
- Lin, L., Posfai, J., Roberts, R. and Kong, H. (2001). Comparative genomics of the restriction modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2740-2745.
- Lin, E., Zhang, X., Levine, S., Girll, S. and Falush, D. (2009). Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragment interrupted by gaps of variable sizes. *PLoS Pathog.* 5: e 1000337.
- Halpern, D., Chiapello, H., Schbath, S., Robin, S., Hennequet - Antier, C., Gruss, A. and El- Karoui, M. (2007). Identification of DNA motifs implicated in maintenance of bacterial core genomes by predictive modeling. *PLoS Genet.* 3: e 153 .
- Furuta, Y., Yahara, K., Hatakeyama, M. and Kobayashi, I. (2011). Evolution of CagA oncogene of *Helicobacter pylori* through recombination. *PLoS ONE*, 6: e 23499 .
- Higashi, H., Tustsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Hatakeyama, M. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 14428-14433.
- Yamaoka, Y., E-Zimaity, H. and Gutierrez, O. (1999). Relationship between the CagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori* gastric histology and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*, 117: 342 -349.
- Miura, M., Ohnishi, N., Tanaka, S., Yanagiya, K. and Hatakeyama, M. (2009). Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice. *Int. J. Cancer*, 125: 2497-2504.
- Onishi, N., Yaasa, H. and Tanaka, S. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induced gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 1003- 1008.
- El-Etr, S., Mueller, A., Tompkins, L., Falkow, S. and Merrell, S. (2004). Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J. Inf. Dis.* 190: 1516-1523 .
- Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N. and Morikawa, H. (2009). *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation -independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host and Microbe*, 5: 23-34 .
- Segal, E., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. and Tompkins, L. (1999). Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 14559-14564.
- Bhat, N., and Zhang, P. (1999). Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen- activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal- regulated kinase in hydrogen peroxide - induced cell death. *J. Neurochem.* 72: 112-119.
- Park, B., Yoo, C., Kim, H., Kwon, C. and Kim, Y. (2005). Role of mitogen -activated protein kinases in hydrogen peroxide - induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* 215: 115-125.
- Backert, S., Tegtmeyer, N. and Selbach, M. (2010). The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master Key hypothesis. *Helicobacter*, 15: 163-176.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. and Meyer, T. (2001). Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for the induction of scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 42: 631-644.
- Batista, S., Rocha, G., Rocha, A., Saraiva, J., Cabral, M., Oliveira, R. and Queiroz, D. (2011). Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC. Microbiol.* 11:61-67
- Salih, B., Bolek, B. and Arikan, S. (2010). DNA sequence analysis of CagA 3' motifs of *Helicobacter pylori* strains from patients with peptic ulcer diseases. *J. Med. Microbiol.* 59: 144-148.
- Amieva, M., Vogelmann, R., Covacci, R., Tompkins, L., Nelson, W., and Falkow, S. (2003). Distribution of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 300: 1430-1434.
- Azuma, T., Yamazaki, S. and Yamakawa, A. (2004). Association between diversity in the Src homology 2 domain - containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J. Infect. Dis.* 89: 820-827.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D. and Sepulveda, A. (1998). Variants of the 3' region of the CagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different H. pylori associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2258-2263.
- Yamaoka, Y., Orito, E., Mizokami, M., Gutierrez, O., Saitou, N. and Kodama, T. (2002). *Helicobacter pylori* in North and south America before Columbus. *FEBS Lett.* 517: 180-184 .
- Xia, Y., Yamaoka, Y., Zhu, Q., Matha, I. and Gao, X. (2009). A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the

- C- terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. PLoS ONE, 4: e7736.
30. Ren, S., Higashi, H. and Lu, H. (2006). Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. J. Biol. Chem. 281: 32344-32352.
31. Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat. Rev. Cancer, 4: 688-694.
32. Reyes-Leon, A., Atherton, J., Argent, R., Puente, J. and Torres, J. (2007). Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the CagA gene. Infect. Immun. 75: 3345-3354.
33. Argent, R., Kidd and M., Owen, R. (2004). Determination and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 127: 514-524.
34. Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N. and Saito, Y. (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1b / MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature 447: 330-333.
35. Yamaoka, Y., Kodama, T., Gutierrez, O., Kim, J., Kashima, K., and Graham, D. (1999). Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. J. Clin. Microbiol. 37: 2274-2279.

Polymorphisms of *Helicobacter pylori* CagA Toxin Isolated from Iraqi Patients

Elham A. Kalaf¹, Zahra M. AL-Khafaji¹, Nahi Y. Yassen², Saad N. Sadwen³

¹ Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Post Graduate Studies / Baghdad University

² Iraqi Center of Cancer and Medical Genetics Researches/ Almustanseria University

³ Al-Kadhimiya Teaching Hospital / Baghdad

Abstract :

Helicobacter pylori Causes a wide range of gastric diseases. The bacteria is genetically unstable which is reflected on its virulence factors and type of diseases. *H. pylori* (210) isolated from Iraqi patient, they were studied to determine the CagA 3' region to estimate the tyrosine phosphorylation site i.e. EPIYA motifs. Results revealed that the EPIYA of Iraqi patients belongs to Western type, different combination were recorded such as AC, BC, ABCCC. CagA multimerization (CM) sequences belong mainly to western type, each molecule has 2 CM sequence regions, in addition Iraqi strains exhibited other type of CM motifs which different from Western and East Asian CMs, but they are present in public databases as it appeared when searching such databases using BLAST program.