بررسی ناحیه متغیرانتهای '۳ ژن cag A در سویه های هلیکوباکتر پیلوری جداسازی شده از بیماران دچار التهاب معده

لیلا شکرزاده[1*]، کاوه بقایی[1]، الهه تاج الدین[1]، فرشته جعفری[2]، حسین دبیری[2]، سارا صیادی[2]، محمدرضا زالی[3]

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دایره بیماریهای ناشی ازغذا و اسهال های مزمن
۲. دکترای تخصصی میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دایره بیماری های ناشی از غذا واسهال های مزمن
۳. فوق تخصص بیماریهای گوارش، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد

* **نشانی برای مکاتبه :** تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان تابناک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، تلفن:۰۲۱۲۲۴۳۲۵۱۸، نمابر فاکس:۰۲۱۲۲۴۳۲۵۱۷ ، l.shokrzadeh@gmail.com

دریافت مقاله: خرداد هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: مرداد هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *هلیکوباکتر پیلوری در پیشرفت سرطان معده و زخم معده شرکت دارد. مهمترین فاکتور بیماری زایی محصول ژن cagA می باشد که بعد از انتقال به سلول های اپیتلیال معده در سطح درونی غشای پلاسمایی جمع شده و تیروزینی که روی Glu Pro-lle-Tyr-Ala(EPIYA) قرار دارد، فسفریله می کند. گزارش شده است ،چهار قطعه موتیف های EPIYA شامل A- ،B- ،C- D نقش مهمی در بیماری های گوارشی دارند. هدف از این مطالعه بررسی نقش موتیف های EPIYA در بیماری های گوارشی در جمعیت ایرانی است.*

روش کار: *۹۲بیمار ایرانی سوء هاضمه cagA مثبت شامل : زخم های گوارشی (۱۱ نفر) ، سرطان معده (۴ نفر) و بدون زخم (۷۷نفر) بررسی شدند. ژنوتیپ موتیف EPIYA با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و تعیین توالی مشخص شد.*

یافته ها: *۸۶ سویه (۹۳/۵ ٪) ۳ نسخه از EPIYA (نوع A,B,C) ، ۳ سویه (۳/۳ ٪) ۴ نسخه (نوع ABCC) و ۳ (۳/۳ ٪) ۲ کپی (نوع AB) بود. تعیین توالی نشان داد که هیچ نوع سوش DEPIYA-D در جمعیت ایرانی وجود نداشت.*

نتیجه گیری: *ساختمان انتهایی ۳ ژن cagA در سویه های ایرانی مشابه سویه های غربی بود. همچنین در این مطالعه رابطه ای بین انواع EPIYA و نتایج بالینی پیدا نشد. شیوع کم با چندین سویه EPIYA-C ممکن است دلیل بروز سرطان معده در ایران باشد.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری، cagA، EPIYA*

مقدمه

عفونت هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی التهاب مزمن معده ، بیماری زخم معده و مخاط مرتبط با بافت های لنفوم لنفاوی شناخته شده است و همچنین عامل خطر برای توسعه سرطان معده است(۱،۲). تنوع ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری بیش از سایر باکتری ها است و همچنین چندین عامل بیماری زا ، مانند cagA و vacA ، می تواند به عنوان عامل پیشگیری ابتلا به بیماری مورد استفاده قرارگیرند(۵-۳). ژن cagA در انتهای یک قطعه DNA ۴۰ کیلوبازی به نام جزیره بیماری زایی (cag pathogenicity island) قرار گرفته است (۶) که سیستم ترشحی نوع IV را کد می کند و از طریق آن پروتئین CagA به سلول های اپیتلیالی معده میزبان انتقال داده می شود(۱۱-۷). به محض ورود پروتئین CagA تیروزینی که روی موتیف های Glu –Pro-lle-Tyr-Ala(EPIYA) قرار دارد، فسفریله شده و با انواع مولکول های هدف وارد میانکنش می شود. مطالعه روی SH2 (Src homology 2) سیتوپلاسمی دمین (SHP-2 Src homology 2 phosphatase) نشان داده است که جهش هایی از SHP2 در بدخیمی های مختلف انسانی و تغییر سیگنالینگ SHP- 2 در پیشرفت آدنوکارسینوم معده و در بروز سرطان معده دخالت دارد(۱۲). بنابراین تصور می شود ، موتیف های EPIYA در ژن cagA در سیگنال های مربوط به CagA - SHP - 2 سلول های اپیتلیال معده میزبان نقش مهمی داشته باشند(۱۴،۱۳).

Archive of SID
www.SID.ir

تغییراتی در منطقه انتهای '۳ ژن cagA وجود دارد که بین گونه های هلیکوباکتر پیلوری کشورهای آسیای غربی و شرقی متفاوت است(۱۶،۱۵،۵،۴). سویه های آسیای غربی و شرقی ۲ منطقه تکراری دارند : اولین منطقه تکراری ۵۷ جفت باز و دومین منطقه تکراری ۱۰۲ جفت باز و۱۶۲ جفت باز است(۴). اولین و دومین مناطق تکراری، موتیف های EPIYA را شامل می شود. اخیرا ، طبقه بندی دیگری با توجه به چهار توالی متفاوت اطراف EPIYA ارائه شده است که شامل، D- ،C-، B- EPIYA-A، می باشند(۱۸،۱۷). B- EPIYA-A، در هر دو بخش آسیا غربی و شرقی و مشابه با اولین منطقه تکراری است ؛ در حالی که EPIYA-C مختص گونه های غربی و EPIYA-D مختص گونه های آسیا شرقی است. در تعیین توالی CagA مشخص شده است که حاوی قطعات تکراری EPIYA می باشد.بر اساس تعداد EPIYA و نوع توالی بعد از این موتیف به شکل A_n, B_n, C_n, D_n نامگذاری شده است. بر اساس تفاوت های ساختاری EPIYA-C و EPIYA-D ، CagA نوع آسیا شرقی فعالیت قوی تر برای اتصال SHP - 2 و توانایی بیشتری برای القاء تغییرات مورفولوژی در سلول های اپیتلیال معده در مقایسه با نوع غربی دارد(۱۹). علاوه بر این ، تعدادی از قطعات EPIYA به ویژه دومین منطقه تکراری دراتصال SHP2 و فسفریله کردن CagA نقش دارند(۲۱،۲۰). همچنین تکرار قطعات EPIYA خطر بروز سرطان معده افزایش می دهد(۲۳،۲۲،۲۰،۵،۴).

ایران در شرق میانه بین کشورهای اروپا و آسیای شرقی قرار گرفته است ، و روابط اقتصادی و فرهنگی با هر دو کشور دارد. اگر چه الگوی شیوع ژنوتیپ vacA در ایران مشابه کشورهای اروپایی است. تاکنون در مورد تشابه توالی EPIYA ژن cagA در سویه های ایرانی با غربی ونقش تعداد و نوع قطعات EPIYA در گونه های ایرانی با بیماری های معده مطالعات زیادی صورت نگرفته است(۲۸،۲۹). در حال حاضر ، تنها دو مطالعه روی EPIYA در ایران انجام شده است. اما در هیچ یک از مطالعات انجام شده تعیین توالی مناطق تکراری و اینکه سویه های ایرانی طبق تقسیمات EPIYA جزء سویه های آسیای شرقی و غربی است صورت نگرفته است(۲۹). بنابراین، هدف از این مطالعه تایپینگ منطقه متغیر انتهای '۳ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری سویه های ایرانی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و تعیین توالی EPIYA می باشد.

روش کار

۱۹۰ بیمار با ملیت ایرانی (۸۱ مرد و ۱۰۹ زن) با متوسط سن ۱/۶±۴۵/۴سال وارد مطالعه شدند. این بیماران با علائم سوء هاضمه در بیمارستان طالقانی تهران اندوسکوپی شدند. در تشخیص اندوسکوپی بیماران به سه دسته : زخم های گوارشی ، سرطان معده و سوء هاضمه بدون زخم (NUD) گروه بندی شدند. بیماران NUD هیچ ضایعات اندوسکوپیک از زخم و یا بدخیمی نداشتند. پس از اندوسکوپی ، نمونه های بیوپسی آنترم معده برای وجود هلیکوباکتر پیلوری توسط کشت و PCR مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی به تصویب رسید و از کلیه شرکت کنندگان در مطالعه رضایت نامه ای اخذ شد. از هر فرد، دو نمونه بیوپسی گرفته شد و در محیط تیوگلیکولات حاوی ۱/۳ گرم در لیتر آگار و ۳ ٪ عصاره مخمر به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه های بیوپسی معده در BHI آگار با ۱۰ ٪ خون گوسفند کشت داده شدند. سپس محیط کشت ها به مدت ۵-۳ روز در جار با شرایط ۵٪ O_2 ، ۱۰ ٪ CO_2 و ۸۵ ٪ N_2 در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. هلیکوباکتر پیلوری توسط رنگ آمیزی گرم ، مورفولوژی کلنی ، اکسیداز، اوره و کاتالاز مثبت شناخته شدند. ژنوم DNA هلیکوباکتر پیلوری با کیت QIAamp استخراج شد.برای تایید وجود ژنوم DNA هلیکوباکتر پیلوری از جفت پرایمر ژن glmM 5'- GATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG-3' و 5'- GCTTACTTTCTAACACTAACGC -3' که یک قطعه ۲۹۶ جفت بازی را کد می کند، استفاده شد(۳۰). برای تشخیص وجود ژن cagA نیز پرایمرهای 5' - AACAGGACAAGTAGCTAGCC - 3' و ('5'-TATTAATGCGTGTGTGGCTG – 3' با اندازه ۳۴۹ جفت باز استفاده شد(۳۱).تکثیر منطقه متغیر انتهای '۳ باپرایمرهای cag2 ('5'- GGAACCCTAGTCGGTAATG -3') و cag4 ('5' – ATCTTTGAGCTTGTCTATCG-3') استفاده شد(۳۲). حجم PCR در این مطالعه ۲۵ ماکرولیتر که شامل ۵۰۰ ماکرومول بافر X ۱۰ ، ۲ میکرومول در لیتر $MgCl_2$ ؛ ۲۰۰ میکرومولار dNTP، 1.5 واحد آنزیم DNA پلیمراز و ۲۰۰ نانوگرم DNA بود. PCR در ترموسایکلر تحت شرایط زیر قرار انجام شد: ۵ دقیقه در دمای ۹۴ ^{o}C و سپس ۳۰ سیکل شامل :۹۳ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه ، ۵۸ به مدت ۳۰ ثانیه ، ۷۲ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه وتکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه . محصولات PCR بدست آمده راروی ژل ۱/۲٪ الکتروفورز شدند. هلیکوباکتر پیلوری ۲۶۶۹۵ به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

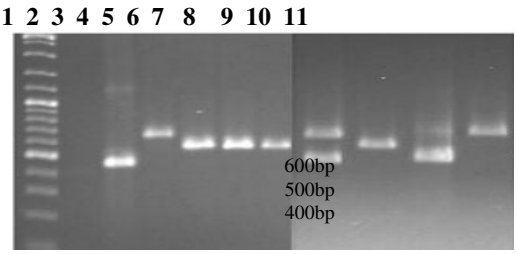
تخلیص محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز منطقه متغیر انتهای '۳ ژن cagA با استفاده ازکیت QIA صورت گرفت. BigDye برای تعیین توالی استفاده شد. تعیین توالی نوکلئوتیدها با استفاده از نرم افزار BioEdit انجام شد. سپس با توالی ژن cagA گونه های هلیکوباکتر پیلوری 26695 که قبلا درGenBank ثبت شده است مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS انجام شد. داده های بدست آمده با استفاده از آزمون t و آزمون فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اگر p کوچکتر از ۰/۰۵ بود نتیجه معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از ۱۹۰ نفر ، ۱۴۱(۷۴/۲٪) به هلیکوباکتر پیلوری آلوده بودند که ۹۲سویه (۷۳/۶٪) ژن cagA داشتند از جمله ۷۷ (۵۵/۴٪) سویه از ۱۲۱ بیمار NUD، ۱۱(۶۸/۸ ٪) از ۱۶ بیمار مبتلا به زخم گوارشی و ۴ بیمار مبتلا به سرطان معده، آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با ژنوتیپ cagA مثبت بودند. تفاوت معنی دار آماری در ژن cagA مثبت ، سن و جنسیت در میان بیماری های مختلف وجود نداشت. از میان ۹۲ سویه cagA مثبت ، با روش PCR نوع EPIYA نشان داد که ۸۶ سویه (۹۳/۵٪) ۳ نسخه از EPIYA (نوع A,B,C) ، ۳ سویه (۳/۳ ٪) ۴ نسخه (نوع ABCC) و ۳سویه (۳/۳ ٪) ۲ کپی (نوع AB) داشتند (جدول ۱). هیچ سوش DEPIYA-D در جمعیت ایرانی مشاهده نشد. میانگین سنی بیماران مبتلا به نوع سوش ABCC بالاتر از انواع دیگربود. منطقه متغییر انتهایی '۳ ژن cagA در ۹۶،۷ ٪ سویه (n = ۸۹) از cagA مثبت جدا شده تکثیر شد. از ۸۹ موارد شناسایی شده ۸۶ سویه یک باند و۳ سویه دو باند مشاهده شد. در مقایسه اندازه محصولات PCR یک باند با دو باند این سه سویه در گروه ABCC (۲ سویه) و گروه AB (۱ سویه) طبقه بندی شدند (شکل ۱).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرازناحیه انتهای متغیر'۳ cagAمی باشد. ردیف۱، ladder mix ، ردیف ۲ ، کنتـرل منفـی، ردیف ۳ EPIYA_AB ، ردیف ۴ EPIYA-ABCC ، ردیـف ۵و ۶ EPIYA-ABC ، ردیـف ۷ Helicobacter pylori 26695 (EPIYA-ABC) ، ردیف ۸ (EPIYA-AB/ABCC ABCC) در روش EPIYA Typing)، ردیـف ۹ EPIYA-ABC ، ردیـف ۱۰ EPIYA-AB/ABCC(AB در روش EPIYA typing)، ردیف ۱۱ EPIYA-ABCC.

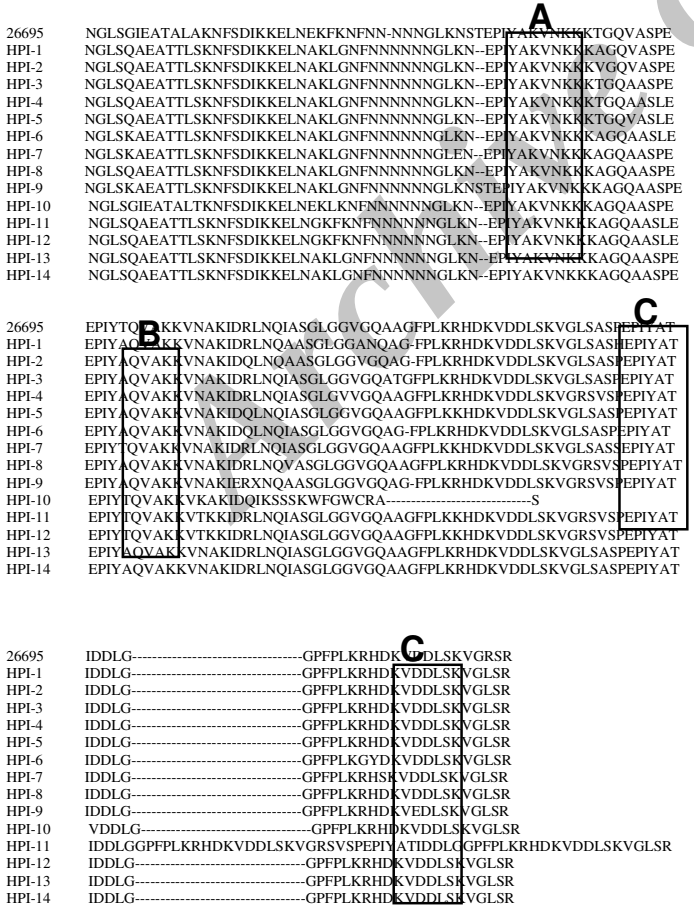
جدول ۱. تنوع cagA با توجه به ژنوتیپ موتیف های EPIYA در ایزوله های کلینیکی cagA مثبت

ژنوتیپ موتیف EPIYA	تعداد	سن	PUD	NUD	GC
AB	۳	۴۱/۷±۲/۷	۰	۳	۰
ABC	۸۶	۴۵/۳±۱/۷	۱۰	۷۳	۳
ABCC	۳	۵۳/۳±۹/۹	۱	۱	۱

GC: سرطان گاستریت، NUD: بد هضمی بدون زخم، :PUD بیماری های زخم معده

شکل ۱. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرازناحیه انتهای متغیر'۳ cagA مـی باشـد. ردیـف۱، ladder mix ، ردیـف ۲ ، کنتـرل منفـی، ردیـف ۳ EPIYA_AB ، ردیـف ۴ EPIYA-ABCC ، ردیـف ۵و ۶ EPIYA-ABC ، ردیـف ۷ Helicobacter pylori 26695 (EPIYA-ABC) ، ردیـف ۸ (EPIYA-AB/ABCC ABCC) در روش EPIYA Typing)، ردیف ۹ EPIYA-ABC ، ردیف ۱۰ EPIYA-AB/ABCC(AB در روش EPIYA typing)، ردیف ۱۱ EPIYA-ABCC.

برای مقایسه و دستیابی به اطلاعات بیشتر منطقه متغیر انتهایی 'cagA ۳ ژن در جمعیت ایرانی ، تعیین توالی نوکلئوتیدی شد. ۱۴سویه به طور تصادفی از جمله ۵ سویه از بیمار NUD، 5 سویه از بیمار زخم معده و ۴ سویه از بیماران مبتلا به سرطان انتخاب شدند. تعیین توالی نوکلئوتیدها سه نوع EPIYA تایید کرد که : EPIYA-A - برای PIYAKVNKKK(A/T/V/S) ؛ EPIYA-B برای EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNAKI و EPIYA-C برای EPIYATIDDLG می باشند (شکل ۲). هیچ سویه نوع آسیا شرقی EPIYA-D (EPIYATIDFDEANQAG) مشاهده نشد. اطلاعات توالی نوکلئوتید در GenBank شماره J849779- FJ849792 ثبت شد.



شکل ۲: تطبیق ناحیه انتهای متغیر'۳ cagA با توجه به تعداد و و نوع موتیف های EPIYA

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

CagA پروتئین بسیار ایمونوژنیک با وزن مولکولی بین ۱۲۰۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰۰ می باشد(۳۴،۳۳). تنوع در اندازه CagA به علت تعداد متغیر توالی تکراری EPIYA در منطقه متغیر انتهایی '۳ است(۳۳،۱۵،۵،۴). دو جایگاه اتصال Csk بخش EPIYA-A و EPIYA-B و همچنین جایگاه اتصال SHP-2 در CagA ایزوله های غرب و آسیا شرقی به ترتیب بخش EPIYA-C وEPIYA-D تعیین شده است(۳۶،۳۵،۲۱،۱۷). EPIYA-D به طور موثرتری و با افینیتی بالا به دمین های (SHP-2(pY-[V/T/A/I/S]-X-[L/I/V]-X-[F/W] SH2 متصل می شود(۳۵). بنابراین ، فعالیت قوی تر SHP - 2 برای اتصال نوع CagA آسیای شرقی نسبت به CagA نوع غربی گزارش شده است(۳۵) .در مطالعه حاضر ، هیچ سویه EPIYA-D مشاهده نشد .همچنین در بررسی های گذشته در ایران وجود این سویه گزارش نشده است(۲۸). همچنین در بررسی ما الگوی شیوع ژنوتایپ vacAs وvacAm در ایران نیز مشابه کشورهای اروپایی بود. فقدان CagA نوع ABD ممکن است دلیلی برای کاهش بروز سرطان معده در ایران باشد. در کشورهای غربی ، شواهدی وجود دارد که تعدادی از انواع EPIYA ، به خصوص EPIYA-C در توسعه بیماری معده نقش دارد(۲۳،۲۰،۵). در مطالعات گذشته(۲۸) و بررسی حاضر نقشی برای EPIYA-C در توسعه بیماری معده پیدا نکردند. بروز سرطان معده در کشورهای غربی نیز متغیر و در کلمبیا و ایتالیا نسبتا بالا است. شیوع سویه های با بیش از یک تکرار (مثل ABCC) در کلمبیا۵۱/۱ درصد و در ایتالیا۳۳/۳ درصد گزارش شده(۵) که بسیار بالاتر نسبت به مطالعه حاضر (۳/۳ درصد) و مطالعه گذشته در ایران (۱۲ ٪) بوده است. همچنین شیوع سویه های با تعداد متعدد EPIYA-C در عراق گزارش نشده است(۲۸). به طور کلی ، در این مطالعه تفاوتی بین انواع EPIYA و نتایج بالینی پیدا نشد. شیوع کم با چندین سویه EPIYA-C ممکن است دلیل بروز سرطان معده در ایران باشد. ممکن است در هر منطقه مورد مطالعه شیوع چندین سویه EPIYA-C نشانگر خوبی برای پیش بینی ابتلا به سرطان معده باشد. مطلب جالب این است که میانگین سنی بیماران مبتلا به نوع سوش ABCC بالاتر از انواعABC بود. بررسی ها نشان داده است که سویه های هلیکوباکتر پیلوری با بخش های متعدد EPIYA در شرایط اسیدی بالا توسط کشت یا روش PCR قابل شناسایی نیستند تا زمانی که با افزایش سن سطح اسید کاهش و تعداد بیشتری از این سویه ها قابل شناسایی می شوند(۵).

با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات اخیر(۲۸) در ایران رابطه ای بین انواع EPIYA و نتایج بالینی پیدا نشده است. این ممکن است به دلیل تعداد کم بیمار در هر دو مطالعه باشد. احتمال دیگر این است که این به علت عدم سالم بودن cag PAI در گونه های ایرانی باشد. اخیرا در ایران ۶۲/۳ درصد حذف بخشی از cag PAI گزارش شده است(۳۷) که ممکن است CagA نقشی در عملکرد سیستم ترشح چهارم نداشته باشد. شیوع نسبی حذف cag PAI در سویه های ایرانی بسیار بالاتر از مناطق دیگر است(۳۸،۳۹) . امید است درآینده مطالعات بیشتری روی مناطق تکراری cagA در رابطه با سیستم ترشح نوع چهارم انجام شود.

در بررسی حاضر برای اولین بار تعیین توالی منطقه تکراری cagA در سویه های ایرانی انجام شد. در مطالعات قبلی ، عدم وجود مناطق متغیر cagA برای تعیین توالی دلیلی بر گونه های cagA منفی بود(۴۰) . در حالی که در این مطالعه سه مورد با سویه های cagA مثبت تکثیر نشدند. از آنجا که مناطق cagA متغیر هستند باید چند جفت پرایمر به شناسایی مناطق، برای تایپینگ و تعیین توالی استفاده شود. یکی از مزایای تعیین توالی این است که حتی یک جهش اسید آمینه غیر ممکن تشخیص داده می شود. همانطور که در بالا ذکر شد ، تفاوت های مهم بین EPIYA-C و EPIYA-D تنها تفاوت یک اسید آمینه است (یعنی EPIYA-C شامل EPIYATIDD و EPIYA-D شاملEPIYATIDF) ؛ این تفاوت تایپینگ بر اساس سیستم های PCR تشخیص داده نمی شود . خوشبختانه در این بررسی هیچ موردی EPIYA-D مشاهده نشد. تعیین توالی نشان داد که در مواردی از EPIYA-B ، توالی EPIYT وجود داشت. همه موارد در EPIYA-C و EPIYA-A ، توالی EPIYA بودند. به نظر می رسد تفاوتی بین توانایی اتصال SHP 2 بین EPIYA و EPIYT در EPIYA-C وجود ندارد. تفاوت بین EPIYA و EPIYT در EPIYA-B ناشناخته است. به هر حال ، تعیین توالی اطلاعات بیشتری از تایپینگ بر اساس PCR به تنهایی ارائه می دهد. بنابراین ، برای شناسایی نقش مناطق EPIYA در پاتوژنز معده با استفاده از تعیین توالی، مطالعات گسترده ای با تعداد سویه های ایرانی بیشتری ضروری خواهد بود.

Archive of SID

REFERENCES

1. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N. Engl. J.Med. 2002; 347: 1175–86.

2. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N. Engl. J. Med. 2001; 345: 784–9.

3. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem. 995; **270**: 17771–7.

www.SID.ir

4. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3′region of the cagA gene in Helicobacter pylori isolates from patients with different H. pylori-associated diseases. J.Clin. Microbiol. 1998; 36: 2258–63.

5. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O et al. Relationship between the cagA 3′repeat region of Helicobacter pylori, gastric histology, and susceptibility to low pH. Gastroenterology 1999; 117: 342–9.

6. Censini S, Lange C, Xiang Z et al. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and diseaseassociated virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93:14648–53.

7. Asahi M, Azuma T, Ito S et al. Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J. Exp.Med. 2000; 191: 593–602.

8. Backert S, Ziska E, Brinkmann V et al. Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. Cell. Microbiol. 2000; 2: 155–64.

9. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2000; 287: 1497–500.

10. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1999; 96: 14559–64.

11. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 1263–8.

12. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. Science 2002; 295: 683–6.

13. Judd LM, Alderman BM, Howlett M et al. Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. Gastroenterology 2004; 126: 196–207.

14 .Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. Nat. Med. 2002; 8: 1089–97.

15. Yamaoka Y, Osato MS, Sepulveda AR et al. Molecular epidemiology of Helicobacter pylori: separation of H. pylori from East Asian and non-Asian countries. Epidemiol. Infect. 2000; 124: 91–6.

16. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M et al. Helicobacter pylori in North and South America before Columbus. FEBS Lett. 2002; 517: 180–4.

17 .Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. Nat. Rev. Cancer 2004; 4: 688–94.

18. Hatakeyama M. The role of Helicobacter pylori CagA in gastric carcinogenesis. Int. J. Hematol. 2006; 84: 301–8.

19. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A et al. 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.

20. Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of Helicobacter pylori. Gastroenterology 2004; 127: 514–23.

Archive of SID
www.SID.ir

21.Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R et al. Influence of EPIY: A-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of Helicobacter pylori CagA. Gastroenterology 2006; 130: 1181–90.

22. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S et al. Correlation between variation of the 3′region of the cagA gene in Helicobacter pylori and disease outcome in Japan. J. Infect. Dis. 2002; 186: 1621–30.

23. Basso D, Zambon CF, Letley DP et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. Gastroenterology 2008; 135: 91–9.

24. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M et al. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology 2007; 133: 926–36.

25. Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M et al. A genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. World J.Gastroenterol. 2006; 12: 5205–10.

26. Siavoshi F, Malekzadeh R, Daneshmand M, Ashktorab H. Helicobacter pylori endemic and gastric disease. Dig. Dis. Sci. 2005; 50: 2075–80.

27. Mohammadi M, Oghalaie A, Mohajerani N et al. Prevalence of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin and its allelic mosaicism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. Bull. Soc. Pathol. Exot. 2003; 96: 3–5.

28. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y et al. Differences in virulence markers between Helicobacter pylori strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in H .pylori-associated disease. J. Clin. Microbiol. 2008; 46: 1774–9.

29. Salehi Z, Jelodar MH, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. Helicobacter pylori cagA status and peptic ulcer disease in Iran. Dig. Dis. Sci. 2009; 54: 608–13.

30. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I et al. Comparative genomics of Helicobacter pylori isolates recovered from ulcer disease patients in England. BMC Microbiol. 2005; 5: 32.

31. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 2274–9.

32. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple method for determination
of the number of Helicobacter pylori CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 791–5.

33. Covacci A, Censini S, Bugnoli M et al. Molecular characterization
of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 1993; 90: 5791–5.

34 .Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect. Immun. 1993; 61:1799–809.

35. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of Helicobacter pylori virulence factor CagA in mammalian cells. J. Biol. Chem. 2005; 280: 23130–7.

Archive of SID
www.SID.ir

36. Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA—a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. Int. J. Cancer 2006; 119: 1217–23.

37.Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F et al. Determination of Helicobacter pylori virulence by analysis of the cag pathogenicity island isolated from Iranian patients. Dig. Liver Dis. 2009 (in press).

38. Hsu PI, Hwang IR, Cittelly D et al. Clinical presentation in relation to diversity within the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. Am. J. Gastroenterol. 2002; 97: 2231–8.

39. Kauser F, Khan AA, Hussain MA et al. The cag pathogenicity island of Helicobacter pylori is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:5302–8.

40. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K et al. 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. 2007; 45: 488–95

Archive of SID

www.SID.ir