

ELŻBIETA KATARZYNA JAGUSZTYN-KRYNICKA*, RENATA GODLEWSKA*,
PAWEŁ ŁANIEWSKI

*Uniwersytet Warszawski
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl
renatag@biol.uw.edu.pl
pablolania@o2.pl*

HELICOBACTER PYLORI – PATOGEN ROKU 2005

Nagrodą Nobla w roku 2005 z dziedziny fizjologii i medycyny zostali uhonorowani dwaj naukowcy z Australii: Robin Warren i Barry Marshall, za odkrycie *Helicobacter pylori* i wyjaśnienie jego roli w indukcji stanu zapalnego błony śluzowej żołądka oraz choroby wrzodowej. Wyniki zapoczątkowanych przez nich eksperymentów udowodniły, że choroby przewodu pokarmowego, uznawane za skutek niewłaściwej diety i stresu, są chorobami zakaźnymi, podobnie jak np. dur brzuszny czy czerwonka. Wykazanie powiązania pomiędzy infekcją bakteryjną a chorobą wrzodową doprowadziło do zrewolucjonizowania stosowanych terapii; zastąpienia terapii objawowych (zaleczanie wrzodów żołądka) przez terapię przyczynową (terapia antybiotykowa doprowadzająca do eradykacji patogenu¹). Dodatkowo, odkrycie uhonorowane tegoroczną Nagrodą Nobla zainspirowało badania naukowe mające na celu wyjaśnienie przyczyn innych chronicznych stanów zapalnych, jak np. choroba Leśniowskiego-Crohna (przewlekły stan zapalny ścian przewodu pokarmowego) czy miażdżycę naczyń krwionośnych. Coraz więcej danych doświadczalnych wskazuje na powiązanie występowania arteriosklerozy z chroniczną infekcją obligatoryjnym wewnątrzkomórkowym patogenem *Chlamydia pneumoniae*. Aktualnie nie budzi

też zastrzeżeń twierdzenie, że chroniczne zakażenia drobnoustrojami patogennymi, jak np. *Salmonella enterica* sv Typhi czy niektórymi chorobotwórczymi szczepami *E. coli*, są czynnikiem rozwoju chorób nowotworowych.

Robin Warren, urodził się w 1937 r. w Adelajdzie (Południowa Australia). Po ukończeniu Uniwersytetu w Adelajdzie (1961), pracował jako patolog w szpitalu Królowej Elżbiety w Woodville, w Instytucie Medycyny i Weterynarii w Adelajdzie, Królewskim Szpitalu w Melbourne, a od 1968 r. – w Królewskim Szpitalu w Perth. W latach 70. XX w. zaczyna interesować się spiralnymi bakteriami obecnymi w wycinkach błony śluzowej żołądka pacjentów z objawami stanu zapalnego.

Barry Marshall urodził się w 1951 r. w Kalgoorie (Zachodnia Australia). W 1958 r. rodzina B. Marshalla przeprowadziła się do Perth, gdzie ukończył on Uniwersytet Zachodniej Australii (1974), a następnie pracował w Królewskim Szpitalu w Perth. W 1981 r. B. Marshall rozpoczyna współpracę z R. Warrenem. Prowadzone przez nich eksperymenty doprowadzają do odkrycia, które po wielu latach zostaje uhonorowane Nagrodą Nobla. Dalsze zawodowe życie B. Marshalla poświęcone jest przekonaniu środowiska lekarskie-

*Dwie pierwsze autorki mają taki sam wkład w powstanie tekstu

¹Eradykacja, czyli eliminacja *Helicobacter pylori* poprzez zastosowanie kilkudniowego leczenia antybiotykami.

go, że niezbyt żołądka, choroba wrzodowa dwunastnicy i żołądka oraz choroba nowotworowa żołądka są skutkiem infekcji *H. pylori*. Ponad 10 lat, od 1986 r., B. Marshall prowadzi badania na Uniwersytecie Stanu Wirginia w USA. W 1997 r. wraca do Austr-

lii, gdzie do dziś jest zatrudniony jako profesor na Uniwersytecie Zachodniej Australii w Perth, jako gastroenterolog w szpitalu w Perth oraz kieruje laboratorium *H. pylori* w Centrum Medycznym Królowej Elżbiety II.

HISTORIA ODKRYCIA *HELICOBACTER PYLORI*

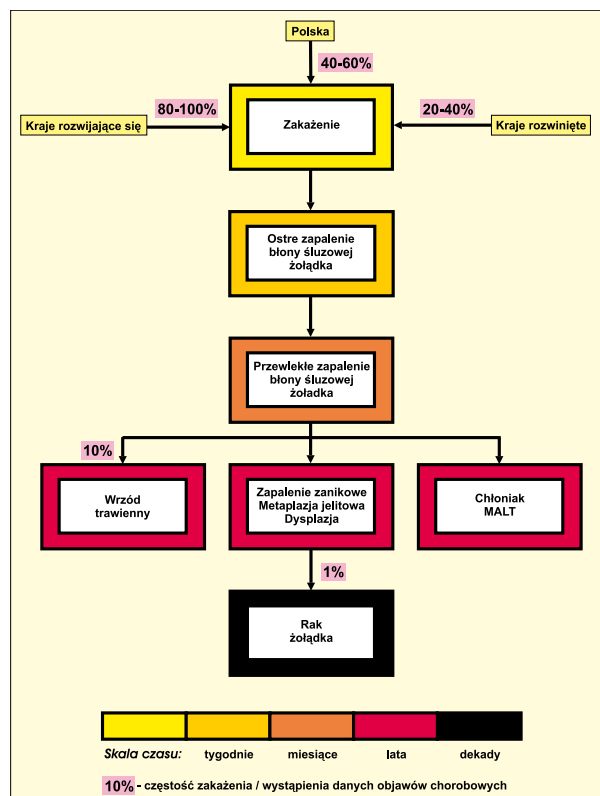
Historia odkrycia *Helicobacter* sięga końca XIX w. W 1875 r. niemiecki bakteriolog G. Botcher we współpracy z francuskim naukowcem M. Letulle zademonstrowali obecność spiralnych bakterii w śluzówce żołądka ssaków i sugerowali powiązanie choroby wrzodowej z obecnością bakterii. W 1889 r. Walery Jaworski, polski lekarz, profesor medycyny Uniwersytetu Jagiellońskiego, opisał występowanie spiralnych bakterii w treści żołądkowej uzyskanej od chorego człowieka. Izolowane, spiralne mikroorganizmy nazwał *Vibrio rugula* i również postulował, że infekcje bakteryjne mogą odgrywać rolę w patogenezie chorób żołądka. W 1893 r. włoski lekarz G. Bizzozero wyizolował z żołądka psa spiralne bakterie – prawdopodobnie był to *Helicobacter heilmanni*. Trzy lata później H. Salomon udokumentował możliwość przeniesienia infekcji na inne gatunki ssaków. Próbkami śluzówki od psów udało mu się zainfekować myszy, u których w kilka dni po doustnym podaniu zakaźnego materiału zaobserwowano silną kolonizację błony śluzowej żołądka. W następnych latach jeszcze kilkakrotnie pojawiały się doniesienia o odkryciu obecności bakterii w żołądkach ssaków. W większości przypadków uznawano je za przedstawicieli krętków. Spiralne mikroorganizmy z ludzkiego żołądka wyizolowało i wyhodowało, po raz pierwszy, *in vitro*, na sztucznych podłożach, dwóch australijskich lekarzy – Robin Warren i Barry Marshall, dopiero w 1982 r. R. Warren, w przebadanym w okresie trzech lat materiale (135 próbek tkanek pobranych od osób chorych), stwierdził wyraźną korelację pomiędzy obserwowanymi zmianami histopatologicznymi, a występowaniem spiralnych bakterii. Próba otrzymania czystej kultury mikroorganizmów zakończyła się powodzeniem, ponieważ Au-

stralijczycy zaklasyfikowali izolowane bakterie do rodzaju *Campylobacter*, a nie jak poprzednio sugerowano do krętków, i jako pierwsi zastosowali odpowiednie warunki hodowli (odpowiednie podłoże, mikroaerofilne warunki oraz stosunkowo długi czas hodowli – 6 dni). Dziesięć lat przed nimi, H. W. Steer też wyizolował od pacjenta z objawami stanu zapalnego żołądka spiralne bakterie i, jak można sądzić z opublikowanego zdjęcia z mikroskopu elektronowego, był to *H. pylori*, ale z pobranych prób udało mu się w warunkach tlenowych wyhodować jedynie *Pseudomonas aeruginosa*. W 1985 r. Barry Marshall, aby udowodnić, że wyizolowane drobnoustroje są u ludzi czynnikiem etiologicznym niezbyt żołądka, wypił zawiesinę bakterii, co po 14 dniach spowodowało u niego silny stan zapalny błony śluzowej żołądka. Objawy chorobowe ustąpiły po zastosowaniu odpowiedniej kuracji antybiotykowej (KIDD i MODLIN 1998). Tym samym wykazał, że badane mikroorganizmy, początkowo zaklasyfikowane do rodzaju *Campylobacter*, spełniają tzw. postulaty Kocha² i powinny być uznane za czynnik etiologiczny chorób górnych odcinków przewodu pokarmowego. Dalsze analizy biochemiczne, genetyczne oraz mikrobiologiczne, spowodowały wyodrębnienie nowego rodzaju – *Helicobacter*, a bakterię izolowaną od ludzi nazwano *Helicobacter pylori*. *H. pylori* charakteryzuje się silnym tropizmem gatunkowym, jest patogenem ludzkim. Do rodzaju *Helicobacter* należą jeszcze inne gatunki izolowane z układu pokarmowego zwierząt (np. psów, kotów, fretek): *H. canis*, *H. felis*, *H. mustelae*. Zakażającym ludzi patogenem tego rodzaju jest też *H. hepaticus*, a infekcje tym mikroorganizmem uznawane są za czynnik ryzyka rozwoju chorób nowotworowych wątroby.

² „Postulaty Kocha”, pozwalają określić czy dany mikroorganizm rzeczywiście jest czynnikiem etiologicznym konkretnej choroby: (i) organizm musi być znaleziony u wszystkich chorych osobników i nie występować naturalnie u zdrowych osobników, (ii) organizm powinien dać się wyizolować z chorych osobników i hodować w czystych kulturach w warunkach laboratoryjnych, (iii) wyizolowany organizm powinien powodować pojawienie się objawów choroby u zarażonych zwierząt, identycznych do obserwowanych uprzednio, (iv) powinna być możliwa ponowna izolacja mikroorganizmów z zarażonych zwierząt.

EPIDEMIOLOGIA I OBJAWY CHOROBY

Częstość występowania zakażenia *H. pylori* związana jest z sytuacją ekonomiczną. Dane epidemiologiczne wskazują, że około 50% ludzkiej populacji jest zakażona tym patogenem, ale odsetek w krajach rozwijających się jest znacznie wyższy (70–90%) niż w krajach rozwiniętych (25–50%). W Polsce zakażonych jest 40–60% ludzi (DZIENISZEWSKI i współaut. 2004). Podatność na infekcję jest większa u osób starszych, choć do zakażenia dochodzi najczęściej we wczesnym dzieciństwie, najprawdopodobniej drogą kropelkową. Infekcja utrzymuje się przez całe życie człowieka i często jest bezobjawowa. Tylko u około 10% zakażonych osób dochodzi do zmian morfologicznych w błonie śluzowej żołądka: choroby wrzodowej, rzadziej raka żołądka, chłoniaka typu MALT lub choroby Ménériera. Dlatego też, w 1994 r., WHO zaliczyła *H. pylori* do I klasy karcinogenów. Rodzaj występujących zmian chorobowych zależy przede wszystkim od szczepu bakteryjnego (jego czynników wirulencji) oraz od cech gospodarza (predyspozycji genetycznej, intensywności odpowiedzi ze strony układu immunologicznego na infekcję, diety, warunków życia) (Ryc.1).



Ryc. 1. Zmiany chorobowe wywołane zakażeniem *Helicobacter pylori*.

PODSTAWOWE CZYNNIKI WIRULENCJI.

Pomimo, że coraz więcej wiadomo na temat czynników wirulencji *H. pylori* i ich oddziaływania z układem immunologicznym człowieka, wciąż jesteśmy dalecy od pełnego zrozumienia mechanizmów patogenności tej bakterii. Do głównych czynników wirulencji tego patogenu zalicza się obecnie: enzymy ułatwiające kolonizację – ureazę, katalazę, lipazy, fosfolipazy, proteazy; adhezyny; cytotoksynę wakuolizującą VacA, białko CagA, białka budujące aparat sekrecyjny typu IV (transportujący m.in. CagA do komórek eukariotycznych); białko aktywujące neutrofile NapA i wiele innych. Przeprowadzone ostatnio eksperymenty (ang. signature tagged mutagenesis, mutageneza STM) zidentyfikowały 47 genów *H. pylori*, których produkty odgrywają znaczącą rolę w procesie kolonizacji śluzówki żołądka (KAVERMANN i współaut. 2003).

Ograniczone rozmiary niniejszego artykułu uniemożliwiają szczegółowe opisanie roli wszystkich wymienionych białek.

UREAZA

Ureaza jest głównym czynnikiem warunkującym kolonizację błony śluzowej żołądka przez *H. pylori*. Enzym, katalizujący reakcję rozkładu mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla, wytwarzany jest przez wszystkie opisanie dotychczas szczepy i stanowi 6–10% białek bakterii. Nagromadzony amoniak, alkalinizując środowisko, powoduje neutralizację soku żołądkowego, co w konsekwencji pozwala komórkom *H. pylori* bezpiecznie sforsować warstwę śluzu i dotrzeć do nabłonka.

Amoniak, powstający w reakcji hydrolizy mocznika przez ureazę, indukuje, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio, powstawanie uszkodzeń komórek tkanki nabłonkowej. Amoniak, w środowisku wodnym, dysocjuje uwalniając jon amonowy i jony OH⁻, te drugie mają toksyczny wpływ na komórki eukariotyczne (SMOOT i współaut. 1990). Aktywność ureazy może być także odpowiedzialna za uszkodzenia nabłonka żołądka, poprzez

interakcje z układem immunologicznym gospodarza. Kontakt komórek bakteryjnych z komórkami układu immunologicznego (np. z neutofilami) powoduje uruchomienie tlenowych mechanizmów zabijania drobnoustrojów. Sugeruje się, że nadtlenek wodoru utlenia jony chlorowe, które następnie reagują z amoniakiem, uwalnianym po hydrolizie mocznika przez ureazę, i powstaje silnie cytotoksyczna monochloramina (SUZUKI i współaut. 1992). Monochloramina, wywiera mutageny efekt na DNA komórek eukariotycznych, tak więc może być istotnym czynnikiem doprowadzającym do powstawania nowotworów u osób z chroniczną infekcją. Ponadto, sama ureaza może powodować aktywację monocytów, uruchamianie odpowiedzi przeciwzapalnej, której efektem jest uszkodzenie nabłonka śluzówki żołądka (MAI i współaut. 1992).

W produkcję ureazy zaangażowanych jest co najmniej siedem genów, skupionych w dwóch obszarach genomu. Geny: *ureAB* kodują dwie podjednostki enzymu, a *ureIEFGH* – białka pomocnicze, konieczne do wbudowywania jonów niklu do centrum aktywnego i białko związane z transportem mocznika (UreI). UreI funkcjonuje jako kanał błony wewnętrznej, transportujący mocznik do komórki, a jego aktywność stymulowana jest spadkiem pH środowiska zewnętrznego. Kanał zostaje otwarty, gdy pH w otoczeniu bakterii spada poniżej 6,5.

CYTOTOKSYNA WAKUOLIZUJĄCA VACA

Gen kodujący białko VacA jest obecny w genomach wszystkich izolowanych szczepów *H. pylori*, choć około 50% szczepów nie ma właściwości cytotoksycznych. Udokumentowano, że w szczepach Tox⁻, które nie indukują wakuolizacji w komórkach eukariotycznych transkrypcja genu *vacA* zachodzi na dużo niższym poziomie niż w szczepach fenotypowo Tox⁺ (FORSYTH i współaut. 1998).

Białko VacA, należące do klasy autotransporterów (V typ sekrecji), ma oligomeryczną budowę. Natywna proteina składa się z sześciu lub siedmiu podjednostek, a jej struktura przypomina kształtem kwiat z sześcioma lub siedmioma płatkami (LANZAVECCHIA i współaut. 1998). Prekursor cytotoksyny VacA składa się z trzech domen: 33 aminokwasowej sekwencji sygnałnej, właściwej cytotoksyny wydzielanej z komórki (~ 90 kDa) i C-terminalnej domeny związanej z komórką (~ 50 kDa). VacA jest poddawana specyficznemu procesowaniu (cięciu proteolityczne-

mu), w wyniku którego powstaje 37/33 kDa N-terminalny fragment (P37) i 58/55 kDa fragment C-terminalny (P58). Uważa się, że 58 kDa podjednostka jest odpowiedzialna za wiązanie z receptorem, a 37 kDa warunkuje wytworzenie kanału w błonie komórki eukariotycznej. Do wywołania efektu wakuolizacji konieczna jest obecność kompleksu białkowego utworzonego z obu domen VacA (P37 i P58). W eksperymentach *in vitro*, poddanie komórek eukariotycznych niezależnemu działaniu rekombinowanych białek P37 lub P58 nie wywoływało tego efektu (TORRES i współaut. 2005). Większość cytotoksyny odnajdywana jest w supernatancie hodowli *H. pylori*, choć część cząsteczek dojrzałej VacA pozostaje związana z powierzchnią komórki bakteryjnej. Receptorami dla cytotoksyny na powierzchni komórek eukariotycznych są: 140 kDa białko p140 zidentyfikowane jako RPTP (ang. receptor-like protein tyrosine phosphatase) i 250 kDa białko p250 – RPTP, w zależności od rodzaju komórek (YAHIRO i współaut. 1997, 1999). Dodatkowo VacA rozpoznawana jest, w procesie zależnym od obecności cholesterolu, w błonie komórki docelowej, przez odporne na działanie detergentów mikrodomeny błony, tzw. lipid rafts (SCHRAW i współaut. 2002, RIEDER i współaut. 2005).

Poddanie cytotoksyny krótkiemu działaniu kwaśnego pH powoduje dysocjację oligomeru VacA i powstanie monomerów. Podjednostka P58 wiąże się z receptorem na powierzchni komórki eukariotycznej, wraz z podjednostką P37 wbudowuje się w błonę tej komórki i tworzy kanał selektywnie przepuszczający aniony. Następnie, cytotoksyna na drodze endocytozy dostaje się do endosomu, co powoduje wzrost przepuszczalności jego ścian i akumulację jonów. Proces internalizacji VacA przebiega w strukturach przypominających kaweole i jest uzależniony od przemian aktywnego cytoszkieletu komórek (RICCI i współaut. 2000). W wyniku tych zjawisk, do wnętrza endosomu napływa woda powiększając go i w efekcie powstaje wakuola (REYRAT i współaut. 1999). W proces powstawania wakuoli, oprócz białka VacA, zaangażowanych jest kilka innych białek, m.in. markery tzw. późnych endosomów i lizosomów – Rab7 i białko błonowe Lgp110; RAC1, dynamina; V-ATPaza. Wykazano, że cytotoksyna (jak również ureaza, białko CagA i inne białka kodowane przez geny wyspy patogenności) może wpływać na wzmożoną apoptozę jelitowych komórek nabłonkowych.

Poza opisaną funkcją wakuolizacji i stymulacji apoptozy, cytotoksyna indukuje rozluźnienie ścisłych powiązań pomiędzy komórkami nabłonka oraz funkcjonuje jako permeaza ureazowa. Dodatkowo, białko VacA bezpośrednio moduluje aktywność komórek układu immunologicznego: blokuje proces dojrzewania fagosomów, hamuje proces prezentacji antygenów i proliferacji limfocytów T oraz obniża poziom odpowiedzi immunologicznej Th1. Wszystkie te procesy niewątpliwie ułatwiają ustanowienie chronicznej infekcji (BLASER i ATHERTON 2004, RIEDER i współaut. 2005).

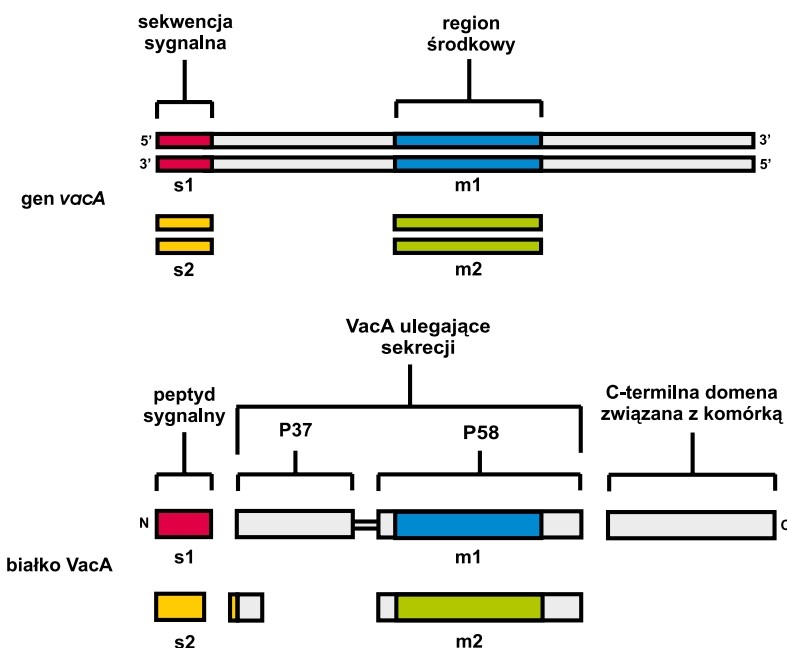
H. pylori uznawany jest za patogen zewnątrzkomórkowy, tylko niewielki procent komórek mikroorganizmu odnajdywanych jest, w doświadczeniach *in vitro*, wewnątrz komórek eukariotycznych (zarówno linii nabłonkowych, jak i pochodnych makrofagów) zamkniętych w wakuoli. W stanie żywym i ruchliwym mogą w tej niszy przetrwać kilka dni, po czym uwalniane są do środowiska. W procesie blokowania utworzenia fagolizosomu, indukowanym prawdopodobnie przez VacA, wykorzystywane jest jedno z białek eukariotycznych określane skrótem TACO (ang. tryptofan-aspartate-containing coat protein). Białko to gromadzone w błonie komórkowej, z błony fagosomu jest uwalniane bezpośrednio po pobraniu przez makrofaga obcego materiału. Zatrzymywanie TACO w błonie fagosomu, zjawisko, w którym aktywnie uczestniczą komórki patogenu, upodabnia ją do błony otaczającej komórkę, co jest prawdopodobnie bodźcem blokującym uwalnianie zawartości lizosomalnej do wnętrza fagoso-

mu (RADOSZ-KOMONIEWSKA i współaut. 2005, RIEDER i współaut. 2005)

Gen kodujący cytotoksynę wakuolizującą *H. pylori* charakteryzuje się mozaikowatą budową (Ryc. 2). Obszary o silnie konserwowanej sekwencji nukleotydowej przeplatają się z fragmentami o sekwencji wysoce zmiennej. Odcinek DNA kodujący C-terminalną domenę protoksyny oraz segment genu kodujący fragment N dojrzalego białka jest silnie konserwowany we wszystkich szczepach. Zmienność wykazuje środkowy region genu, kodujący fragment VacA odpowiedzialny za wiązanie z komórką docelową (tzw. region m., ang. middle-region) oraz fragment kodujący sekwencję sygnałną białka (tzw. region s, ang. signal sequence). Znane są przynajmniej trzy typy sekwencji sygnałnej, oznaczone s1a, s1b i s2 oraz cztery allele regionu m. – m1, m2, m1* (m1-like), m1*-m2. Wśród badanych, pod tym względem, szczepów *H. pylori* odnaleziono wszystkie możliwe kombinacje genotypu genu *vacA*, oprócz s2/m1. Szczepy z genotypem *vacA* s1a odpowiedzialne są za najsilniejsze reakcje ze strony układu immunologicznego człowieka. Od pacjentów ze zmianami nowotworowymi najczęściej izolowane są szczepy z allelem *vacA* s1/m1. Białko produkowane przez szczepy o genotypie *vacA* s2/m2 nie wykazuje aktywności cytotoksycznej (YAMAOKA i współaut. 1998).

BIAŁKO CAGA I WYSPA PATOGENNOŚCI

Gen *cagA* (ang. cytotoxin-associated gene A), kodujący silnie immunogenne 120–145kDa białko CagA, znajduje się w obszarze wyspy patogenności PAI (~ 40 kb),



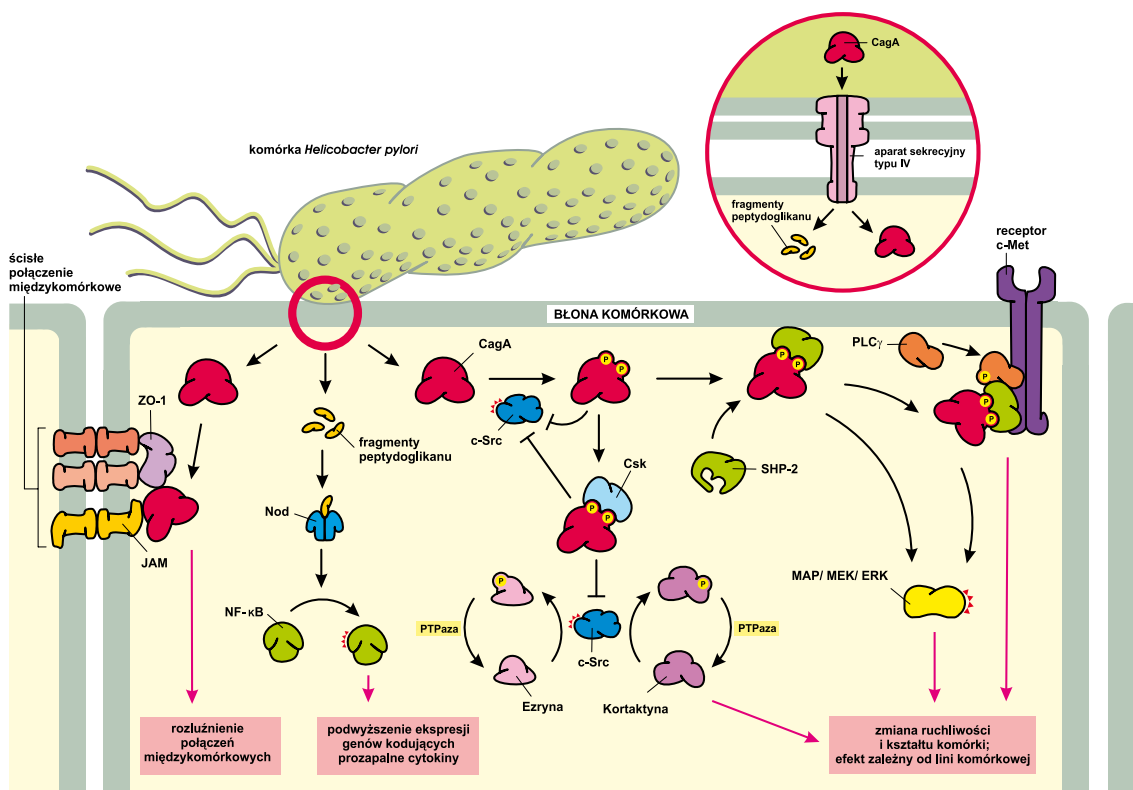
Ryc. 2. Mozaikowa budowa genu *vacA*.

fragmentu genomu nabytego w drodze horyzontalnego transferu. Oprócz genu *cagA*, zlokalizowane są tam również inne geny związane z patogennością *H. pylori*, głównie budujące aparat systemu sekrecji typu IV – TFSS (ang. type four secretion system). Większość szczepów *H. pylori*, wywołujących poważne objawy chorobowe u ludzi, zawiera w swoim genomie wyspę patogenności. Za pośrednictwem systemu TFSS, białko CagA jest transportowane z komórki bakteryjnej do komórki eukariotycznej. Do zajścia procesu transportu CagA niezbędna jest aktywność 18 z 27 genów PAI, podczas gdy 14 z nich bierze udział w stymulacji wytwarzania IL-8 przez komórki eukariotyczne (FISCHER i współaut. 2001). CagA jest białkiem wielofunkcyjnym, modulującym wiele ścieżek sygnalizacyjnych. Niektóre indukowane efekty są skutkiem stymulacji/zahamowania kilku szlaków transdukcji sygnału. Na terenie komórki docelowej tyrozyna motywu/ów EPIYA CagA ulega fosforylacji przez kinazę Src. Gen *cagA*, podobnie jak *vacA*, charakteryzuje się silnym polimorfizmem. Dotyczy on głównie liczby i sekwencji flankujących motywy fosforylacji zlokalizowanych w domenie karboksylowej CagA (HIGASHI i współaut. 2002). Szczepy izolowane od pacjentów z USA, zachodniej Europy oraz Australii (tzw. typ zachodni; Western type), zawierające inny układ motywów fosforylacji niż szczepy typu wschodnio azjatyckiego (East-Asian type), infekujące mieszkańców Chin, Korei i Japonii, indukują znacznie niższy poziom stanu zapalnego (AZUMA i współaut. 2004). Po infekcji spolaryzowanej linii komórkowej MDCK przez *H. pylori*, CagA odnajdywane jest z dwoma proteinami gospodarza JAM (ang. junctional adhesion molecule) i ZO-1 (ang. tight junction scaffolding protein). To oddziaływanie, niezależne od procesu fosforylacji, powoduje, że komórki nabłonkowe przestają ściśle do siebie przylegać i zmienia się ich morfologia (AMIEVA i współaut. 2003), co umożliwia patogenowi oddziaływanie z innymi receptorami zlokalizowanymi na przypodstawnej powierzchni komórek nabłonkowych (WALLASCH i współaut. 2002). Ufosforylowana proteina CagA reaguje z wieloma białkami. Jednym z dokładniej poznanych szlaków jest ścieżka zapoczątkowywana oddziaływaniem z domeną SH2 (ang. src-homology domain 2) tyrozynowej fosfatazy SHP-2, co doprowadza do zmiany konformacji SHP-2 i skutkuje stymulacją szlaku przekazywania sygnału MAP/MEK/ERK (ang. MAP kinase/

MAP kinase kinase/extracellular signal regulated protein kinase). Jego rozregulowanie, w wyniku działania białka CagA, prowadzi do nieprawidłowej proliferacji komórek, zmiany ich kształtu (wydłużanie, tzw. fenotyp kolibra – ang. hummingbird) i ruchliwości (fenotyp rozproszony – ang. scattered). Ten sam szlak przekazywania sygnału zapoczątkowywany jest tworzeniem kompleksu białkowego pomiędzy połączonym z błoną ufosforylowanym CagA a proteiną Grb2 (ang. growth factor receptor bound 2) (MIMURO i współaut. 2002). Intensywność i rodzaj obserwowanych zmian morfologicznych warunkowana jest nie tylko allelem genu *cagA*, ale także genotypem komórki (typ zastosowanej linii komórkowej). CagA indukuje także procesy przekazywania sygnału poprzez oddziaływanie z innymi białkami: fosfolipazą C (PLC-) oraz cytoplazmatyczną domeną receptora c-Met. Ufosforylowane białko CagA, w sposób bezpośredni lub pośredni (oddziaływując z kinazą Csk), blokuje aktywność kinazy Src, kontrolując ten sposób poziom własnej fosforylacji i utrzymując indukowane przemiany na odpowiednim poziomie, co prawdopodobnie ułatwia ustanowienie długotrwałej infekcji (SELBACH i współaut. 2003, TSUTSUMI i współaut. 2003). W komórce obecnych jest wiele substratów kinazy Src, tak więc zahamowanie jej aktywności wywołuje dodatkowe przemiany, np. obniżenie poziomu fosforylacji białek powiązanych z cytoszkieletem, takich jak np. kortraktyna czy ezryna. Główne szlaki przemian indukowane aktywnością CagA ilustruje rycina 3.

Infekcja *H. pylori* indukuje także inne szlaki przekazywania sygnału w sposób zależny od TFSS, ale nie wymagający aktywności białka CagA. Po infekcji, do miejsca przylegania patogenu rekrutowane są małe białka G – GTPazy (Cdc42 oraz Rac1), których aktywacja stymuluje p21 i doprowadza do zmian cytoszkieletu (CHURIN i współaut. 2001). Także uruchomienie systemów przekazywania sygnału indukuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co w konsekwencji prowadzi do produkcji interleukiny 8 (IL-8) i przebiega w sposób niezależny od CagA (VIALA i współaut. 2004).

W ostatnim roku, poza pracami szczegółowymi, ukazało się kilka prac przeglądowych opisujących zmiany w fizjologii komórek eukariotycznych wywoływanych infekcją *H. pylori* (BLASER i ATHERTON 2004, BOURZAC i GUILLEMIN 2005, NAUMANN 2005).



Ryc. 3. Główne szlaki przemian indukowane aktywnością białka CagA.

KARCYNogeneza

Chroniczne infekcje bakteryjne, powiązane z indukcją stanu zapalnego oraz uszkodzeniem komórek gospodarza, niewątpliwie są czynnikiem ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. Infekcja *Helicobacter* doprowadza do zachwiania homeostazy komórek nabłonkowych, równowagi pomiędzy procesami apoptozy a proliferacji. W większości analizowanych przypadków, eradykacja patogenu doprowadzała do obniżenia poziomu proliferacji komórek. Choć badania epidemiologiczne bezspornie udokumentowały, jak wspomniano wyżej, że ludzie zainfekowani szczepami *H. pylori*, produkującymi aktywną toksynę VacA oraz posiadającymi wyspę patogenności CagA, obciążeni są wyższym ryzykiem rozwoju chorób nowotworowych niż ludzie zakażeni szczepami nie posiadającymi tych czynników wirulencji, to molekularny mechanizm tych zjawisk pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniony. Profil ekspresji genów komórek nabłonkowych żołądka, po kontakcie ze szczepami *cagA*⁺ PAI lub *cagA*⁻, analizowany przy zastosowaniu cDNA mikropaneli, wykazuje znaczące różnice. Dotyczą one głównie genów związanych z procesami

apoptozy i regulacji cyklu komórkowego. Tylko szczepy niosące pełną PAI zdolne są do stymulowania kaskady sygnałowej, skutkującej aktywacją NF- κ B, choć mechanizm tego zjawiska pozostaje nie w pełni wyjaśniony. Udokumentowano, że w przeciwieństwie do innych enteropatogenów, *Helicobacter* nie stymuluje ścieżek sygnalizacyjnych związanych z receptorami TLR5, TLR9 i TLR4 (ang. Toll-like receptors), ale produkty rozpadu peptydoglikanu tego mikroorganizmu generowane przez transglikozylazę, będące cząsteczką efektorową TFSS, stymulują wewnątrzkomórkowe receptory Nod (ang. nucleotide-binding oligomerization domain protein), wywołując aktywację czynników transkrypcyjnych. (VIALA i współaut. 2004). Mechanizm indukcji stanu zapalnego przez szczepy *Helicobacter cagA* przebiega poprzez inne szlaki sygnalizacyjne (BLASER i AHERTON 2004, NAUMANN i CRABTREE 2004).

W eksperymentach *in vitro*, *H. pylori*, hodowany w obecności komórek eukariotycznych, wykazuje aktywność zarówno pro-, jak i antyapoptyczną, wpływając na poziom syntezy różnych białek rodziny Bcl-2 (SHIBAYAMA

i współaut. 2001, ZHANG i współaut. 2004). Badania na modelach zwierzęcych sugerują, że końcowy efekt infekcji *H. pylori* jest pro-proliferacyjny i proapoptyczny. Pro-proliferacyjne sygnały, stymulowane między innymi aktywnością CagA (omówione w poprzednim fragmencie tekstu), podwyższają tempo podziału komórek, zwiększając szanse nagromadzenia mutacji, podczas gdy sygnały proapoptyczne wywierają efekt ochronny, prowadząc do usuwania uszkodzonych komórek. Jednak na indukowaną przez bakterie apoptozę, organizm gospodarza odpowiada wzmoczoną proliferacją komórek. *H. pylori*, po adhezji do powierzchni komórki, może indukować apoptozę bezpośrednio (oddziaływanie białek bakteryjnych z czynnikami komórkowymi) lub pośrednio, poprzez indukcję wzmoczonego uwalniania cytokin stanu zapalnego oraz podwyższanie poziomu syntazy NO. Kwestią sporną pozostaje, który z produkowanych przez bakterie czynników odgrywa kluczową rolę w apoptozie. Jednym z nich jest toksyna VacA warunkująca uwalnianie cytochromu *c* z mitochondriów (GALMICHE i współaut. 2000, KUCK i współaut. 2001).

Dodatkowo, *H. pylori* aktywuje geny powiązane z karcynogenezą, między innymi geny kodujące białko p53 (ang. tumor-suppressed protein), białko p52 (ang. cell-cycle inhibitor), cyklooksygenazę 2 (COX2), kinazę JNK, fosfolipazę A oraz białko regulujące cykl komórkowy cyklinę D1 (LAX i THOMAS 2002, NAUMANN i CRABTREE 2004). Nadekspresja cykliny D1 jest uznawana za czynnik wpływający na rozwój nowotworów niektórych organów, a nadekspresja białka COX2, indukująca proliferację komórek oraz proces angiogenezy, przy jednoczesnej supresji procesów apoptozy, sprzyja rozwojowi choroby nowotworowej. Alternatywnie, indukcja produkcji przeciwciał, skierowanych przeciwko niektórym wielocukrom na powierzchni komórek śluzówki (efekt mimikry molekularnej) i niszczących komórki kubkowe nabłonka żołądka, może przyczyniać się do hyperprolifracji komórek macierzystych. Jak widać, nie ma przejrzystego schematu tłumaczącego mechanizm powsta-

wania chorób nowotworowych, będących konsekwencją infekcji *H. pylori*. Można jednak zauważyć, że potencjał wpływu patogenu na procesy komórkowe jest niewyobrażalny. Dodatkowo, niedawno udowodniono, że polimorfizm ludzkich genów kodujących IL-1 odgrywa decydującą rolę w rozwoju choroby nowotworowej żołądka. Jak wspomniano, *H. pylori* kolonizuje śluzówkę żołądka, głównie jego część przedodźwiernikową, wywołując silny stan zapalny. Kolonizacja korpusu żołądka doprowadza do rozwoju hypochlorochydii i stanów atrofii, które uznawane są za stan przednowotworowy. Niektórzy ludzie, nosiciele konkretnych alleli IL-1, są szczególnie podatni na tego typu zmiany. Podczas infekcji *H. pylori* dochodzi u nich do podwyższenia poziomu IL-1 w śluzówce żołądka, co przyczynia się do częściowej eradykacji patogenu, choć jednocześnie występuje obniżenie zawartości kwasu solnego w żołądku, ponieważ interleukina 1 jest silnym inhibitorem jego produkcji. Obniżenie poziomu kwasu ułatwia mikroorganizmowi zmianę miejsca „zamieszkania” i kolonizację korpusu żołądka. Na tym etapie zakażenia ma miejsce kumulacja toksyn bakteryjnych oraz produktów reakcji zapalnej uszkadzających śluzówkę. Zaindukowana infekcją *H. pylori* hypochlorochydia, dodatkowo, znacząco obniża poziom witaminy C, związku neutralizującego wolne rodniki tlenowe uwalniane przez neutrofile. Ponadto, obniżenie stężenia jonów wodorowych umożliwia kolonizację, tej normalnie niedostępnej dla patogenów, niszy ekologicznej przez inne drobnoustroje. Hipotezę tę potwierdzają badania epidemiologiczne; stan zapalny korpusu żołądka przy obniżonym poziomie wytwarzania HCl doprowadza do rozwoju choroby nowotworowej, podczas gdy u pacjentów ze skolonizowaną częścią przedodźwiernikową dochodzi raczej do rozwoju choroby wrzodowej. Polimorfizm genu *IL-1*, powodujący podwyższoną produkcję tej interleukiny wraz z infekcją *H. pylori*, jest więc czynnikiem indukującym kaskadę zachodzących przez lata reakcji, których konsekwencją może być choroba nowotworowa (EL-OMAR i współaut. 2000).

DIAGNOSTYKA

W diagnostyce zakażeń *Helicobacter* rutynowo stosowane są różnorodne testy, zarówno inwazyjne, połączone z badaniem endoskopowym, jak i nieinwazyjne, niewymagają-

ce pobrania fragmentów tkanki nabłonkowej żołądka od pacjenta (HARDIN i WRIGHT 2002, RAUTELIN i MEGRAUD 2003). Badania histopatologiczne wycinków błony śluzowej pozwa-

lają na ocenę zmian tkanki nabłonkowej oraz wykazanie, przy zastosowaniu odpowiednich barwień, obecności komórek *H. pylori*. Występowanie *H. pylori* w materiale z biopsji błony śluzowej podlega weryfikacji, zarówno klasycznymi metodami mikrobiologicznymi i biochemicznymi, jak i metodami biologii molekularnej. Pierwsza z nich, to hodowla bakterii na odpowiednich podłożach i ocena ich fenotypu, zdolności do wytwarzania ureazy, katalazy i oksydazy. Hodowla mikroorganizmu pozwala również na ocenę oporności szczepu na stosowane w terapii antybiotyki. Coraz częściej do wykrywania patogenu w materiale pobranym od pacjentów stosowane są metody biologii molekularnej; testy PCR z użyciem specyficznych starterów. Opracowano także specyficzne startery do reakcji PCR, pozwalające ustalić oporność drobnoustroju na antybiotyki. Klasyczna metoda PCR, w laboratoriach wyposażonych w odpowiedni sprzęt, jest zastępowana zdecydowanie czulszym testem RT-PCR (ang. real-time PCR), umożliwiającym dokładną ocenę gęstości zakażenia. RT-PCR znajdzie też prawdopodobnie zastosowanie do monitorowania skuteczności terapii (MIKUŁA i współaut. 2003).

Z metod nieinwazyjnych w diagnostyce najczęściej stosowane są testy serologiczne

oraz tzw. test oddechowy, pozwalający na wykrycie mocznika w wydychanym przez pacjenta powietrzu. Rutynowo stosowane są różnorodne serologiczne testy diagnostyczne, głównie testy ELISA wykrywające specyficzne przeciwciała klasy IgG, z zastosowaniem różnorodnych antygenów opłaszczających (sonikaty komórek *H. pylori*, oczyszczone frakcje białek lub oczyszczone pojedyncze antygeny, takie jak ureaza czy toksyna). Czulość testu zależy od stosowanego w badaniach antygeny. Testy serologiczne, stosunkowo tanie i proste w wykonaniu, znalazły zastosowanie w badaniach epidemiologicznych, gdy zachodzi potrzeba analizy dużej liczby prób. W ostatnich latach, korzystając z faktu określenia sekwencji nukleotydowej genomu *H. pylori*, prowadzona jest intensywna analiza immunoproteomu mikroorganizmu. W tych badaniach, białka rozdzielone metodą dwukierunkowej elektroforezy poddawane są reakcji z surowicami pobranymi od pacjentów z różnymi objawami chorobowymi. Eksperymenty mają na celu identyfikację antygenów użytecznych w diagnostyce do określenia ryzyka rozwoju konkretnych objawów chorobowych (HAAS i współaut. 2002, UTT i współaut. 2002).

TERAPIA – KOGO I JAK LECZYĆ Z ZAKAŻENIA *H. PYLORI*

Lekarze wciąż nie są zgodni w przypadku których chorób współistniejących z zakażeniem *H. pylori* należy zastosować leczenie antybakteryjne. Przeciwno leczeniu wszystkich osób zainfekowanych *H. pylori* przemawiają nie tylko względy ekonomiczne (wysoki koszt terapii), ale także medyczne. W ostatnich latach wykazano prawdopodobny związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a chorobą refluksową żołądkowo-przełykową. W Stanach Zjednoczonych, gdzie częstość zakażeń *H. pylori* znacznie spadła (wraz z nią częstość występowania wrzodów i raka żołądka), zaobserwowano wzrost zachorowań na choroby przełyku, w tym chorobę nowotworową.

W Polsce w 2004 r. lekarze i bakterioldzy, wchodzący w skład Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologicznego, zaproponowali następujący wykaz wskazań do leczenia zakażeń *H. pylori* (DZIENISZEWSKI i współaut. 2004):

– wrzód dwunastnicy lub żołądka;

- choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy w wywiadzie;
- przebyta operacja z powodu choroby wrzodowej;
- zapalenie żołądka;
- zmiany przedrakowe (zapalenie zanikowe, metaplazja, dysplazja);
- resekcja żołądka z powodu wczesnego raka;
- rak żołądka w rodzinie;
- polipy gruczolakowate i hiperplastyczne żołądka;
- MALT lymphoma żołądka;
- choroba Ménériera;
- dyspepsja czynnościowa (przy braku poprawy lub nawrocie po leczeniu standardowym);
- przewlekłe leczenie niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ);
- na życzenie pacjenta.

Pomimo około dziesięcioletniego doświadczenia w leczeniu zakażeń *H. pylori* lekarze wciąż poszukują najskuteczniejszego sposobu

leczenia. Po zastosowaniu nawet najbardziej skutecznych schematów terapeutycznych, aż do 20% pacjentów pozostaje niewyleczona (GISBERT i PAJARES 2005). Przyczyną jest m.in. wzrastająca częstość występowania oporności szczepów *H. pylori* na wykorzystywane antybiotyki. Najczęściej stosowana jest tzw. terapia potrójna, w której skład wchodzi: lek zmniejszający wydzielanie żołądkowe – sole bizmutu (cytrynian bizmutu) lub inhibitor pompy protonowej (PPI) (omeprazol, lansoprazol lub pantoprazol) oraz dwa antybiotyki (amoksycylina, klarytromycyna, metronidazol lub tynidazol). Dobór antybiotyków zależy od występowania tzw. pierwotnej oporności szczepów *H. pylori*, która może się różnić w poszczególnych krajach. Leczenia trwa zwykle 7 dni.

W Polsce najczęściej stosuje się następujące kombinacje leków: PPI, amoksycylina i klarytromycyna; PPI, klarytromycyna i metronidazol; PPI, amoksycylina i metronidazol. W przypadku niepowodzenia zaleca się zwykle terapię czteroskładnikową: PPI, cytrynian bizmutu, tertracyklina, metronidazol (GISBERT i PAJARES 2005). Przedstawione schematy leczenia, oprócz wysokich kosztów, mają jeszcze jedną wadę: są uciążliwe dla pacjentów. Od 15 do 30% chorych skarży się na występowanie objawów niepożądanych. Są to zaburzenia smaku, nudności, wymioty, bóle brzuch, biegunka. Ponadto, niektóre ze składników (metronidazol) wchodzi w interakcje z alkoholem. Konieczność stosowania równocześnie kilku leków jest również dla wielu ludzi kłopotliwa.

PROFILAKTYKA

Fakt, że *H. pylori* jest drugim, w skali globalnej, co do częstości występowania, ludzkim patogenem, a infekcja często skutkuje poważnymi objawami chorobowymi inspirowała wiele grup badawczych do poszukiwania skutecznych szczepionek anty-*Helicobacter*, zarówno profilaktycznych (dla osób nie zakażonych), jak i terapeutycznych (dla osób już zainfekowanych). Choć prowadzone, we wczesnych latach 90. XX wieku, eksperymenty, głównie na modelu mysim, wykazały ochronny efekt kilku prototypów szczepionek (lizaty komórek mikroorganizmu lub różne antygeny bakterii aplikowane razem z toksynami LT lub CT, jako adiuwantem), większość z nich użyta do immunizacji ludzi nie dała pozytywnego efektu. Dodatkowo, efekt działania prototypów szczepionek był uzależniony od faktu czy poddawane immunizacji zwierzęta lub ludzie byli już zainfekowani *H. pylori* czy też nie. Nadal wiele problemów dotyczących skutecznej i bezpiecznej immunizacji anty-*Helicobacter* wymaga wyjaśnienia. Główne z nich to: wybór właściwego antygeny lub kombinacji antygenów, wybór drogi i sposobu podania antygeny oraz sposobu zaindukowania właściwej, czyli skutecznej odpowiedzi immunologicznej. Indukowana naturalną infekcją, nabyta odpowiedź immunologiczna jest nieskuteczna i musi być odpowiednio wzmocniona przez stymulację wrodzonych mechanizmów obronnych. Podczas infekcji dochodzi do indukcji zarówno odpowiedzi humoralnej (wytwarzanie specyficznych przeciwciał), jak i komórkowej; ak-

tywacja limfocytów T, zarówno klasy Th1 jak i Th2. Analiza poziomu wytwarzanych cytokin wskazuje na przeważającą indukcję drogi Th1, co jest nietypowe dla zewnątrzkomórkowego, wytwarzającego toksynę patogenu, jakim jest *H. pylori*. Większość, stosowanych jak dotąd, preparatów immunizacyjnych indukowała odpowiedź immunologiczną spolaryzowaną w kierunku odpowiedzi Th2, skutkującą produkcją cytokin, np. IL-10, hamujących odpowiedź typu Th1. Także dwa najczęściej stosowane adiuwanty (różne wersje toksyn LT i CT oraz sole aluminium) wzmacniają odpowiedź typu Th2 (PRINZ i współaut. 2003, BLASER i ATHERTON 2004).

Duża liczba białek *Helicobacter*, przeważnie białek zewnątrzkomórkowych będących czynnikami wirulencji, przebadana została pod kątem ich skuteczności w profilaktyce anty-*Helicobacter*. W preparatach immunizacyjnych stosowano: ureazę lub jej podjednostki, VacA, CagA, NAP oraz kilka innych białek zewnątrzkomórkowych biorących udział w procesach adhezji czy interakcji z komórkami gospodarza np. BabA (DEL GIUDICE i współaut. 2001, MICHETTI i SVENNERHOLM 2003). Podawane one były zarówno pojedynczo, jak i w różnych kombinacjach głównie drogą doustną. Ponieważ oczyszczone preparaty białkowe charakteryzują się niską immunogennością, w większości wypadków stosowano różne adiuwanty, głównie wspomniane wyżej pochodne toksyn LT lub CT. Badania, dotyczące typu odpowiedzi immunologicznej indukowanej naturalną in-

fekcją, sugerują zastosowanie jako adiuwantu CpG ODN (sztucznie syntetyzowanych oligonukleotydów z motywem CpG). Ten preparat poprzez oddziaływanie z receptorami TLR9 stymuluje odpowiedź immunologiczną klasy Th1, co powinno wzmocnić skuteczność testowanych preparatów. Obiecujące wyniki wstępnych eksperymentów otrzymano ostatnio, przy uodparnianiu mieszaniną trzech antygenów (CagA, VacA i NAP), aplikowanych drogą pozajelitową (RUGGIERO i współaut. 2003).

Jako nośniki genów *Helicobacter* (gluureazy) testowane są też atenuowane szczepy *Salmonella*. W niektórych przypadkach (*H. pylori* – negatywni ludzie) udokumentowano indukcję odpowiedzi immunologicznej. Inne,

jak na razie znajdujące się w początkowej fazie badań, strategie immunizacji anty-*Helicobacter* to: konstrukcje transgenicznych roślin wytwarzających białka *Helicobacter*, zastosowanie „duchów” drobnoustrojów (osłony komórek bakteryjnych) czy immunizacja przy użyciu czystego DNA (TODOROKI i współaut. 2000, PRINZ i HAFSI 2003, DZWONEK i współaut. 2004, LIU i współaut. 2005, XU i współaut. 2005, ZHANG i współaut. 2005). Poznanie pełnego zapisu genetycznego dwu szczepów *Helicobacter* umożliwiło poszukiwania nowych kandydatów do konstrukcji szczepionek na drodze globalnej analizy transkryptomu lub proteomu mikroorganizmu (BJORKHOLM i SALAMA 2003, WALDUCK i współaut. 2004).

HELICOBACTER PYLORI – NOBEL PRIZE 2005

Summary

The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005 has been awarded jointly to Barry J. Marshall and J. Robin Warren for their discovery of “the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease”. This year’s Nobel Winners made the remarkable and unexpected discovery that inflammation in the stomach (gastritis) as well as ulceration of the stomach or duodenum (peptic ulcer disease) is the result of an infection of the stomach caused by the bacterium *Helicobacter pylori*. Thanks to the pioneering discovery by Marshall and Warren, peptic ulcer disease are no longer a chronic, frequently disabling condition, but a disease that can be cured by a short regimen of antibiotics and acid secretion inhibitors. The discovery of *Helicobacter pylori* has also led to increased understanding of the connection between chronic infection, inflammation and cancer.

Helicobacter pylori, a gramnegative spiral-shaped bacterium, member of -Proteobacteria, colonizes the gastric mucosa of humans. It is now recognized that *H. pylori* infects about half of the world’s population (87% of Polish population). Infection is typically contracted in early childhood, frequently by transmission from mother to child, and the bac-

teria may remain in the stomach for the rest of the person’s life. *H. pylori* has been identified as the causative agent of chronic inflammation, chronic gastritis and peptic ulceration and is believed to be a risk factor for the development of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and adenocarcinoma of the stomach. The World Health Organization has assigned *H. pylori* as class I carcinogens. Although more than 50% of the human population is infected with *H. pylori* only a subset develops the disease. The nature and severity of the disease depend on host characteristics, bacterial genotype and environmental factors.

The focus of this minireview is on three major virulence factors of *Helicobacter pylori*: vacuolating cytotoxin VacA, CagA – an effector molecule of the type four secretion system and urease. VacA and CagA have also immunomodulatory activities that enable *H. pylori* to establish a chronic infection. The molecular basis by which *H. pylori* triggers cell signaling cascades and promotes inflammation and epithelial cell proliferation is described as well. This minireview also highlights recent developments in the field of *H. pylori* diagnosis and vaccine construction.

LITERATURA

- AMIEVA M R., VOGELMANN R., COVACCI A., TOMPKINS L. S., NELSON W. J., FALKOW S., 2003. *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori cagA*. Science 300, 1430–1434.
- AZUMA T., YAMAZAKI S., YAMAKAWA A., OHTANI M., MURAMATSU A., SUTO H., ITO Y., DOJO M., YAMAZAKI Y., KURIYAMA M., KEIDA Y., HIGASHI H., HATAKEYAMA M., 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. 189, 820–827.
- BJORKHOLM B., SALAMA N. R., 2003. *Genomics of Helicobacter*. Helicobacter 8, 1–7.
- BLASER M. J., ATHERTON J. C., 2004. *Helicobacter pylori persistence: Biology and disease*. J. Clin. Invest. 113, 321–333.
- BOURZAC K. M., GUILLEMIN K., 2005. *Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type iv secretion*. Cell Microbiol. 7, 911–919.
- CHURIN Y., KARDALINOVA E., MEYER T. F., NAUMANN M., 2001. *Pathogenicity island-dependent activation of rho gtpases rac1 and cdc42 in Helicobacter pylori infection*. Mol. Microbiol. 40, 815–823.

- DEL GIUDICE G., COVACCI A., TELFORD J. L., MONTECUCO C., RAPPUOLI R., 2001. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Ann. Rev. Immunol.* 19, 523-563.
- DZIENISZEWSKI J., JAROSZ M., GRUPA ROBOCZA PTG, 2004. *Postępowanie w zakażeniu Helicobacter pylori (rok 2004). Wytyczne opracowane przez grupę roboczą polskiego towarzystwa genetycznego.* *Gastroenterol. Pol.* 11, 41-48.
- DZWONEK A., MIKULA M., WOSZCZYNSKI M., HENNIG E., OSTROWSKI J., 2004. *Protective effect of vaccination with DNA of the H. pylori genomic library in experimentally infected mice.* *Cell Mol. Biol. Lett.* 9, 483-495.
- EL-OMAR E., CARRINGTON M., CHOW W., MCCOLL K., BREAM J., YOUNG H., HERRERA J., LISSOWSKA J., YUAN C., ROTHMAN N., LANYON G., MARTIN M., FRAUMENI J. J., RABKIN C., 2000. *Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.* *Nature* 404, 398-402.
- FISCHER W., PULS J., BUHRDORF R., GEBERT B., ODENBREIT S., HAAS R., 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.
- FORSYTH M. H., ATHERTON J. C., BLASER M. J., COVER T. L., 1998. *Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (vacA) transcription among Helicobacter pylori strains.* *Infect. Immun.* 66, 3088-3094.
- GALMICHE A., RASSOW J., DOYE A., CAGNOL S., CHAMBAR D. J. C., CONTAMIN S., DE THILLOT V., JUST I. R. V., SOLCIA E., VAN OBERGHEN E., BOQUET P., 2000. *The n-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.* *EMBO J.* 19, 6361-6370.
- GISBERT J. P., PAJARES J. M., 2005. *Helicobacter pylori "rescue" therapy after failure of two eradication treatments.* *Helicobacter* 10, 363-372.
- HAAS G., KARAALI G., EBERMAYER K., METZGER W. G., LAMER S., ZIMNY-ARNDT U., DIESCHER S., GOEBEL U. B., VOGT K., ROZNOWSKI A. B., WIEDENMANN B. J., MEYER T. F., AEBISCHER T., JUNGBLUT P. R., 2002. *Immunoproteomics of Helicobacter pylori infection and relation to gastric disease.* *Proteomics* 2, 313-324.
- HARDIN F. J., WRIGHT R. A., 2002. *Helicobacter pylori: Review and update.* *Hospital Physician* May, 2 3-3 1.
- HIGASHI H., TSUTSUMI R., FUJITA A., YAMAZAKI S., ASAKA M., AZUMA T., 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. USA* 99, 14428-14433.
- KAVERMANN H., BURNS B. P., ANGERMULLER K., ODENBREIT S., FISCHER W., MELCHERS K., HAAS R., 2003. *Identification and characterization of Helicobacter pylori genes essential for gastric colonization.* *J. Exp. Med.* 197, 813-822.
- KIDD M., MODLIN I. M., 1998. *A century of Helicobacter pylori: Paradigms lost-paradigms regained.* *Digestion* 59, 1-15.
- KUCK D., KOLMERER B., IKING KONERT C., KRAMMER P. H., STREMMEL W., RUDI J., 2001. *Vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS.* *Infect. Immun.* 69, 5080-5087.
- LANZAVECCHIA S., BELLON P. L., LUPETTI P., DALLAI R., RAPPUOLI R., TELFORD J. L., 1998. *Three-dimensional reconstruction of metal replicas of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin.* *J. Struct. Biol.* 121, 9-18.
- LAX A. J., THOMAS W., 2002. *How bacteria could cause cancer: One step at a time.* *Trends Microbiol.* 10, 293-299.
- LIU X. F., HU J. L., QUAN Q. Z., SUN Z. Q., WANG Y. J., 2005. *Systemic immune responses to oral administration of recombinant attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori urease in mice.* *World J. Gastroenterol.* 11, 2154-2156.
- MAI U. E., PEREZ PEREZ G. I., ALLEN J. B., WAHL S. M., BLASER M. J., SMITH P. D., 1992. *Surface proteins from Helicobacter pylori exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa.* *J. Exp. Med.* 175, 517-525.
- MICHETTI P., SVENNERHOLM A. M., 2003. *Helicobacter pylori – inflammation, immunity and vaccines.* *Helicobacter* 8, 31-35.
- MIKULA M., DZWONEK A., JAGUSZTYN-KRYNICKA E. K., OSTROWSKI J., 2003. *Quantitative detection for low levels of Helicobacter pylori infection in experimentally infected mice by real-time PCR.* *J. Microbiol. Methods.* 55, 351-359.
- MIMURO H., SUZUKI T., TANAKA J., ASAHI M., HAAS R., SASAKAWA C., 2002. *Grb2 is a key mediator of Helicobacter pylori CagA protein activities.* *Mol. Cell* 10, 745-755.
- NAUMANN M., 2005. *Pathogenicity island-dependent effects of Helicobacter pylori on intracellular signal transduction in epithelial cells.* *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 335-341.
- NAUMANN M., CRABTREE J. E., 2004. *Helicobacter pylori-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis.* *Trends Microbiol.* 12, 29-36.
- PRINZ C., HAFSI N., 2003. *Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: Implications for therapeutic vaccination.* *Trends Microbiol.* 11, 134-138.
- RADOSZ-KOMONIEWSKA H., BEK T., JOZWIAK J., MARTIROSIAN G., 2005. *Pathogenicity of Helicobacter pylori infection.* *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 602-610.
- RAUTELIN H. L. P., MEGRAUD F., 2003. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection.* *Helicobacter* 8, 13-20.
- REYRAT J. M., PELICIC V., PAPINI E., MONTECUCO C., RAPPUOLI R., TELFORD J. L., 1999. *Towards deciphering the Helicobacter pylori cytotoxin.* *Mol. Microbiol.* 34, 197-204.
- RICCI V., GALMICHE A., DOYE A., NECCHI V., SOLCIA E., BOQUET P., 2000. *High cell sensitivity to Helicobacter pylori VacA toxin depends on a gpi-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis.* *Mol. Biol. Cell.* 11, 3897-3909.
- RIEDER G., FISCHER W., HAAS R., 2005. *Interaction of Helicobacter pylori with host cells: Function of secreted and translocated molecules.* *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 67-73.
- RUGGIERO P., PEPPOLONI S., RAPPUOLI R., 2003. *The quest for a vaccine against Helicobacter pylori: How to move from mouse to man? Microbes Infect.* 5, 749-756.
- SCHRAW W., LI Y., MCCLAIN M. S., VAN DER GOOT F. G., COVER T. L., 2002. *Association of Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts.* *J. Biol. Chem.* 277, 34642-34650.
- SELBACH M., MOESE S., HURWITZ R., HAUCK C. R., MEYER T. F., 2003. *The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-src inactivation.* *EMBO J.* 22, 515-528.
- SHIBAYAMA K., DOI Y., SHIBATA N., YAGI T., NADA T., IINUMA Y., ARAKAWA Y., 2001. *Apoptotic signaling pathway activated by Helicobacter pylori infection and increase of apoptosis-inducing activity*

- under serum-starved conditions. *Infect. Immun.* 69, 3181–3189.
- SMOOT D. T., MOBLEY H. L. T., CHIPPENDALE G. R., LEWISON J. F., RESAU J. H., 1990. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 58, 1992–1994.
- SUZUKI M., MIURA S., SUEMATSU M., SUZUKI H., FUKUMURA D., KUROSE I., SUZUKI H., KAI A., KUDOH Y., OHASHI M., TSUCHIYA M., 1992. *Helicobacter pylori* – associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J. Physiol.* 263, G719–G725.
- TODOROKI I., WATANABE K., MIYASHITA M., SENO K., NOMURA T., YOKOYAMA Y., TOCHIKUBO K., ITOH M., 2000. *Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on Helicobacter pylori* - induced gastritis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 159–163.
- TORRES V. J., IVIE S. E., MCCLAIN M. S., 2005. *Functional properties of the p33 and p55 domains of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. *J. Biol. Chem.* 280, 21107–21114.
- TSUTSUMI R., HIGASHI H., HIGUCHI M., OKADA 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.
- UTT M., NILSSON I., LJUNGH A., WADSTROM T., 2002. *Identification of novel immunogenic proteins of Helicobacter pylori by proteome technology*. *J. Immunol. Meth.* 259, 1–10.
- VIALA J., CHAPUT C., BONECA I. G., CARDONA A., GIRARDIN S. E., MORAN A. P., ATHMAN R., MEMET S., HUERRE M. R., COYLE A. J., DISTEFANO P. S., SANSONETTI P. J., LABIGNE A., BERTIN J., PHILPOTT D. J., 2004. *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. *Nat. Immunol.* 5, 1166–1174.
- WALDUCK A., SCHMITT A., LUCAS B., AEBISCHER T., 2004. *Transcription profiling analysis of the mechanisms of vaccine-induced protection against H. pylori*. *FASEB J.* 18, 1955–1957.
- WALLASCH C., CRABTREE J. E., BEVEC D., ROBINSON P. A., WAGNER H., ULLRICH A., 2002. *Helicobacter pylori-stimulated egf receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 695–701.
- XU C., LI Z. S., DU Y. Q., TU Z. X., GONG Y. F., JIN J., WU H. Y., 2005. *Construction of a recombinant attenuated Salmonella typhimurium DNA vaccine carrying Helicobacter pylori hpaA*. *World J. Gastroenterol.* 11, 114–117.
- YAHIRO K., NIIDOME T., HATAKEYAMA T., AOYAGI H., KURAZONO H., PADILLA P. I., WADA A., HIRAYAMA T., 1997. *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin binds to the 140-kda protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 629–632.
- YAHIRO K., NIIDOME T., KIMURA M., HATAKEYAMA T., AOYAGI H., KURAZONO H., IMAGAWA K., WADA A., MOSS J., HIRAYAMA T., 1999. *Activation of Helicobacter pylori vacu toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kda receptor protein-tyrosine phosphatase beta*. *J. Biol. Chem.* 274, 36693–36699.
- YAMAOKA Y., KODAMA T., KITA M., IMANISHI J., KASHIMA K., GRAHAM D., 1998. *Relationship of vaca genotypes of Helicobacter pylori to caga status, cytotoxin production, and clinical outcome*. *Helicobacter* 3, 241–253.
- ZHANG H., FANG D. C., WANG R. Q., YANG S. M., LIU H. F., 2004. *Effect of Helicobacter pylori infection on expression of bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma*. *World J. Gastroenterol.* 10, 227–230.
- ZHANG H., ZHANG X., LIU M., ZHANG J., LI Y., 2005. *Expression and characterization of Helicobacter pylori HspA protein in transgenic tobacco plants*. *Biotechnol. Appl. Biochem. Sep* 1.