

Molecular and Biochemical Study of some Toxins of *Helicobacter pylori* Isolated from Iraqi Patients دراسة جزيئية و كيموحيوية لبعض سموم البكتريا *Helicobacter pylori* المعزولة من مرضى عراقيين

*زهرة محمود الخفاجي **مريم بشير محمود ***حسن محمود ابو المعالي

****لقاء حسون صكبان الجبوري

*معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد **جامعة بغداد / قسم الشؤون المالية /

علوم حاسبات *** كلية الصيدلة / جامعة كربلاء **** كلية التربية للعلوم الصرفة

/ قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء

المستخلص

تمتلك بكتريا *Helicobacter pylori* العديد من عوامل الضراوة ، و من هذه العوامل سموم جيني VacA و CagA . درست تواليات البروتينات protein sequence لمسموم جين CagA (المنطقة الطرفية '3) وسم VacA بمختلف مناطقه (s,i,m) المعزولة من بكتريا *Helicobacter pylori* لمصابين عراقيين بأمراض مرتبطة بهذه الجرثومة باستخدام برامج مختلفة. و أوضحت النتائج اختلاف في نوعية الحوامض الامينية عن المسجل في السلالات من مناطق أخرى من العالم مثل الصين و اليابان. وامتازت تواليات السم CagA بنوع من الثبوت مقارنة بمناطق VacA التي اختلفت بشكل كبير في السلالات المختلفة . وأظهرت البروتينات صفة كراهية الماء بشكل عام . توزعت الحوامض الامينية على التراكيب الثانوية مثل صفائح بيتا وحلزونات الفا واللفات عشوائية الشكل ، اذ احتوت بعضها على التراكيب الثلاث ، في حين كانت جزيئات VacA / المنطقتين الوسطى والبينية (m,i) خالية من الحلزونات ، اما منطقة الإشارة (s) من السم فامتازت بوجود الحلزونات في s2 والقليل من الصفائح في s1 . درست فعالية السم CagA المعتمدة على الفسفرة وتبين ان البيئة التي يوفرها التوالي EPIYA ضرورية لفسفرة التايروسين اذ لم يكن بالإمكان فسفرته خارج هذا التوالي باستعمال برامج التنبؤ بحدوث عملية الفسفرة. كانت كل التواليات المدروسة مثيرة للمناعة واغلبها عد من عوامل الضراوة . تم حدس تداخلات الجزيئات مع مكونات الخلية الأخرى باستعمال التواليات كأساس للبحث في قاعدة البيانات STRING أظهرت النتائج تداخلات كبيرة وتختلف نوعا ما على الاختلاف في التواليات .

Abstract

Helicobacter pylori have many virulence factors among them CagA and VacA toxins. Protein sequences of these toxins isolated from Iraqi patients were studied using different software. Results showed that amino acids composition is clearly differ from strains of other countries like China and Japan. Amino acids sequences had some conservation compared to VacA sequence(s). Hydrophobicity was the major character of the sequences. Amino acids segregated on different secondary structures : β sheets , α helixes and coils with non-homogenous patterns , some got all the structures , VacA (m and I regions) devoted of α helixes , s1 has α helixes and β sheets , while s2 has only α helixes . Activity studies of CagA which depends on its tyrosine phosphorylation at EPIYA motif revealed that such sequence provide the environment for phosphorylation, since the insertion of tyrosine outside the motif showed no phosphorylation. The study indicates that all sequences are antigenic and most of them are virulent. Their interactions with other cell components using STRING database explain that the interaction is very complicated and depends on sequence.

المقدمة:

تسبب بكتريا *Helicobacter pylori* عددا من الأمراض وتستعمر معدة الإنسان التي تعد من أكثر البيئات تطرفا ، وتعتمد مخرجات الإصابة على العديد من العوامل في مقدمتها السلالة البكتيرية والبيئة المتمثلة بالمضيف (1) . تمتلك البكتريا عدد من عوامل الضراوة المختلفة التأثير منها السم CagA الذي أطلق عليه بروتين السرطان Oncoprotein والذي عند دخوله الى الخلايا يؤدي الى اضطراب مسارات نقل الإشارات الخلوية بين النواة و مناطق الخلية الأخرى ويعيد ترتيب الهيكل الخلوي ، وترتبط السلالات CagA⁺ بحدوث السرطانات كما سجلتها بعض الدراسات (1,2) ، ويوجد في حوالي 60% من السلالات (3) . وعامل الضراوة الآخر هم السم VacA الذي يعمل فجوات في الخلايا التي يصيبها ويؤدي الى اضطراب مسارات الجسيمات الحالة و الاندوسومات ، فضلا عن إطلاقه Cytochrome C من المايكوندريا (1) ، ويوجد في كل السلالات المدروسة ولكن ليس بالضرورة ان تكون نواتج جينه فعالة ، بسبب حدوث الطفرات (3) ، يتكون الجين المسؤول عن السم من ثلاث مناطق رئيسة هي منطقة الإشارة Signal region (s) والتي تحصل فيه تغيرات كثيرة بين السلالات المختلفة ، وبصورة عامة تكون s2 اقل انتشارا . والمنطقة الثانية هي المنطقة الوسطى Mid region (m) والتي لها أكثر من صورة ، والمنطقة الأحدث اكتشافا هي المنطقة البينية Intermediate region (i) وهي الأخرى توجد لها صور مختلفة ، المسجل منها i1 و i2 ولكن وجد نوع آخر i3 في الأتراك (1) . توجد تشكيلات مختلفة من هذه المناطق تختلف باختلاف العرق والمناطق الجغرافية ونمط الحياة وغيرها من المؤثرات (4) ، والإعلان عن ان سلالة ما هي الأكثر ضراوة يكون معتمدا على الدراسة ولا يمكن التعميم (1,3,4) .

وما ذكر أعلاه من تعقيدات يعكس طبيعة البكتريا فجيناتها تشكل موزائيك معقد من الأنماط التي تعتمد على العوامل المحيطة ، وتحدث هذه نتيجة لزيادة عمليات التآشب Recombination بين السلالات . هدفت الدراسة الحالية دراسة بعض مواصفات السموم في السلالات العراقية التي يمكن ان تكون توطئة لتصميم الأدوية واللقاحات الوقائية .

المواد وطرائق العمل :

المواد

تم ايجاد تواليات جزيئة DNA و البروتين لجيني VacA و CagA لاثنان و سبعون سلالة (سبعون سلالة عراقية و اثنان عالمية) من بنك الجينات العالمي في الولايات المتحدة الأمريكية Genbank.

طرائق العمل

بعد ايجاد توالي جزيئة DNA والبروتين للمناطق المدروسة من جيني VacA و CagA تم تحليلها احصائيا باستخدام البرامج والمواقع الالكترونية الخاصة بالمعلوماتية الحيوية Bioinformatics متضمنةً الاتي:
موقع NCBI/ protein (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) للحصول على تواليات الجزيئات للسلالات العراقية و العالمية المودعة في المركز. وبرنامج Mega5 استعمل لصف التواليات وإيجاد المناطق الثابتة Conserved regions في البروتينات. و برنامج Peptide property calculator : GenScript (www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi) لحساب الأوزان الجزيئية وتحديد المواصفات الأخرى للبروتينات. و موقع NetPhos 2.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) لتحديد مواقع فسفرة البروتينات. و موقع BTXPred server (www.imtech.res.in/raghava/btxpred/submission.html) الذي استعمل لتحديد سمية البروتينات ونوعيتها. و برنامج VirulentPred (www.203.92.44.117/virulent) لتحديد ضراوة البروتينات. بالإضافة الى برنامجي RaptorX (www.raptorx.uchicago.edu) و PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>) لإيجاد وتحديد التراكيب الثانوية والتراكيب المجسمة للبروتينات. و برنامج VaxiJen v2.0 (www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) لتحديد المستضدية Antigenicity للبروتينات. و برنامج STRING (http://string-db.org/newstring.cgi/show_input_page.pl) لتحديد ارتباط الجزيئات الحيوية مع بعضها.

النتائج والمناقشة

يمكن ان تعاني البروتينات عددا من التحويرات بعد ترجمتها داخل الخلية ، وهذه ليست لها علاقة بالتركيب الجيني ، وعادة تكون هذه التحويرات متخصصة جدا وتملى من التركيب الأولي للبروتينات لتحدد فيما بعد التركيب الثنائي والثلاثي (5) . وسموم البكتريا *H. pylori* مثل CagA و VacA ذات الطبيعة البروتينية تخضع لهذه التحويرات . تكون فعالية سم جين CagA متركزة في الطرف 3' لذلك تم تضخيم قطعة الجين الخاصة بها من خزع المعدة من المرضى المصابين بالبكتريا (6) ، اما سم جين VacA والذي يحتوي على ثلاث مناطق هي (s,i,m) وتكون مهمة في أداء وظيفة سم VacA مجتمعة ، فقد تم تضخيم وتحديد توالياتها للجين من مرضى مصابين بأمراض مختلفة ناتجة عن وجود *H. pylori* (7) . تم تسجيل تواليات الجينات وما تترجم اليه من بروتينات في مركز NCBI وبأرقام تسجيل استعملت في الحصول على التواليات كما موضحة في الجدول (1).

جدول 1 : أرقام التسجيل لتواليات البروتينات وبعض مواصفاتها

Accession No.	MW	pI
>gi 52696489 gb AAU85846.1 VacA [Helicobacter pylori] Control	80465.11	9.33
S region		
AFN66242	5092.88	4.65
AFN66241	3740.31	6.75
CCW36863	5641.68	8.54
CCW36862	5641.68	8.54
CCW36856	5641.68	8.54
CCW36854	5969.00	10.83
CCW36853	5969.00	10.83
CCW36851	5641.68	8.54
CCW36849	5641.68	8.54
CCW36861 (s2)	5092.88	4.65
CCW36860	5937.98	8.54
CCW36859	6980.94	11.17
CCW36858	5937.98	8.54
CCW36857	5956.02	8.54
CCW36855	6146.14	11.71
CCW36852	5986.04	8.54
CCW36850	6073.11	8.54
CCW36848 (s2)	5092.88	4.65
M region		
AGL42311	17531.55	6.95
AGL42310	20173.39	9.13
AGL42309	20308.60	8.77
AGL42308	20236.49	9.10
AGL42307	20187.42	9.13
AGL42306	20187.42	9.13
AGL42305	20294.53	8.79
AGL42304	20187.42	9.13
AGL42303	20282.48	8.79
AGL42302	17644.63	7.04
AGL42301	17647.67	8.87
AGL42300	17531.55	6.95
AGL42299	17543.48	6.95
AGL42298	20261.42	8.84
AGL42297	17480.47	8.20
AGL42296	20294.53	8.79
I region		
AGL42295	15807.71	9.56
AGL42294	16353.21	6.80
AGL42293	16411.34	8.93
AGL42292	16292.17	8.16
AGL42291	16329.23	8.90
AGL42290	16314.17	6.46
AGL42289	16314.17	8.90
AGL42288	15756.59	8.90
AGL42287	12004.16	6.42

AGL42286	15684.57	9.43
AGL42285	15755.69	9.40
AGL42284	15807.71	9.56
AGL42283	16330.22	8.14
AGL42282	16340.21	6.80
AGL42281	15807.62	8.93
AGL42280	16330.22	8.14
CagA		
gi 22335417 dbj BAC10425.1 CagA [Helicobacter pylori [Control	137981.64	8.64
AFT91250	19565.09	9.22
AFT91249	19683.07	8.88
AFT91248	13949.70	9.30
AFT91247	12949.67	9.46
AFT91246	16985.15	9.52
AFT91245	22170.07	9.38
AFT91244	17500.76	9.20
AFT91243	17405.62	9.55
AFT91242	19703.26	9.42
AFT91241	21784.54	9.16
AFT91240	21686.36	9.50
AFT91239	17469.88	9.57
AFT91238	16272.21	9.02
AFT91237	17318.54	9.55
AFT91236	23024.35	9.68
AFT91235	19856.17	8.03
AFT91234	17438.60	9.18
AFT91233	17534.84	9.47
AFT91232	17296.49	9.35
AFT91231	17505.69	9.35

استعملت التواليفات في دراسة الجوانب المختلفة لها . أظهرت النتائج ان كل البروتينات في الجدول رقم (1) تعمل كمستضدات (Antigens) وبالتالي تثير الجهاز المناعي، وهذا متوقع لان أوزانها الجزيئية عالية كما في الجدول أعلاه . ومن الواضح ان الجزيئات تظهر اختلاف في عدد الحوامض الامينية الداخلة في تركيبها ومختصرة في الآتي (جدول 2)

جدول 2 : معدل أعداد الحوامض الامينية في السموم

VacA			CagA	الصفة
m region	s region	i region		
181.63	56.18	144.56	170	المعدل
12.5	2.61	9.07	24.09	الانحراف المعياري (Std Dev.)

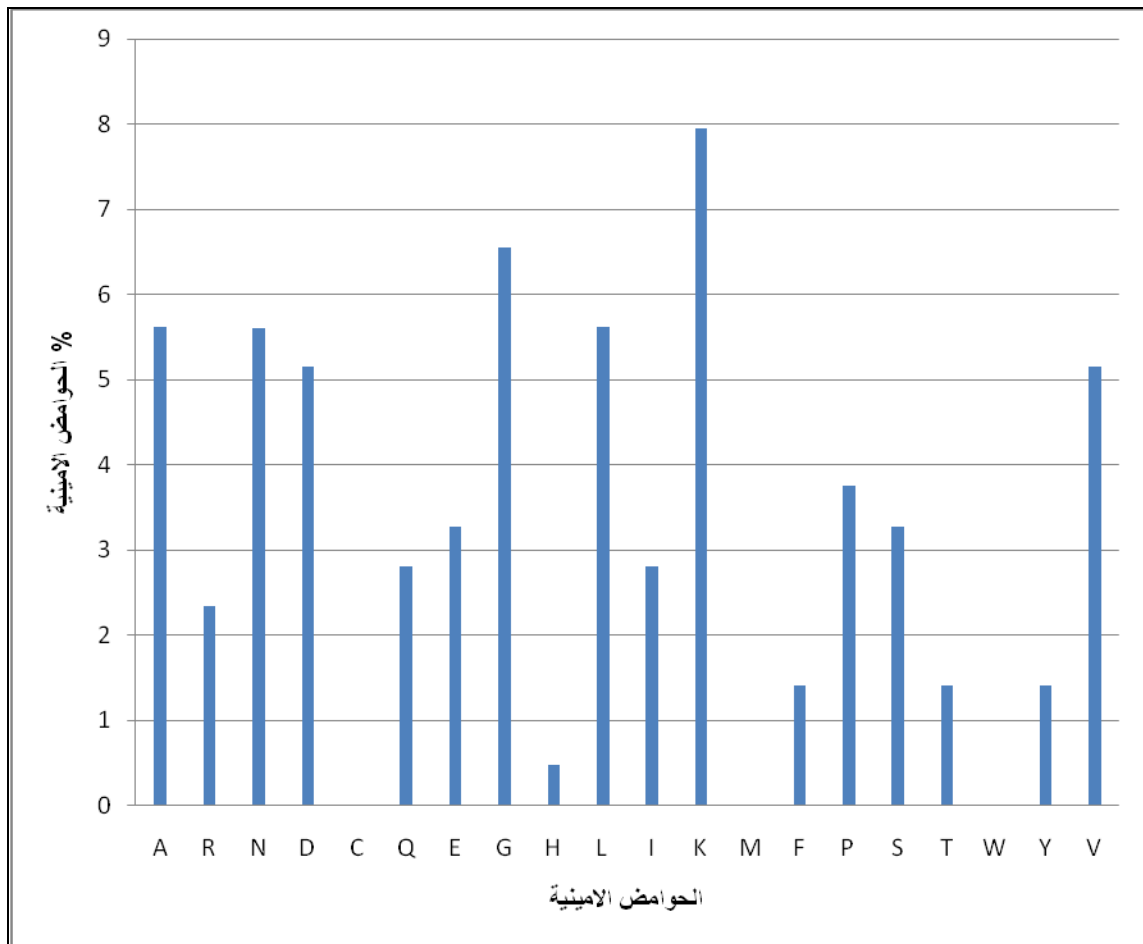
ان اختلاف اطوال سلاسل منطقة CagA التي تتراوح بين 118- 211 حامض اميني يعود الى وجود تكرار من قطيقات Motifs (EPIYA) التي لها علاقة بفسفرة السم (كما سيأتي ذكره لاحقاً) .
ان نوعية الحوامض الامينية ومواقعها تكون أساسية في فهم العمليات البايولوجية مثل تحديد الصفات والوظائف التي تؤديها البروتينات ، ويمكن ان تحصل طفرات تعين في التطبع التطوري ، وهذا ما يحدث في بكتريا *H. pylori* المتقلبة . واهم مواصفات البروتينات تحدد بالبيئة الكيماوية التي توجد فيها ، فالمعروف ان البيئة داخل الخلايا لا تشبه البيئة خارج الخلايا خاصة من حيث درجات الأكسدة والاختزال Redox potential وهذا قد يؤثر بشكل كبير في سلوك البروتينات (5).
اختلفت الجزيئات المدروسة من حيث ثبوت الثمالات ، فجزئيات CagA ظهر فيها اعلى ثبوت في المنطقة الواقعة بين الثمالة رقم 141 و 176 (من مجموع 211 حامض أميني) كما موضح في الشكل (1 / أ).
اما بروتينات VacA بمختلف مناطقها فقد أظهرت القليل من الثبوت ، فتميزت المنطقة البيئية (i region) بثبوت متفاوت تركزت في المنطقة 29-125 (من مجموع 148 حامض أميني) ، وكذلك أظهرت المنطقة الوسطى ثبوتاً في الطرف الاميني



يعد ثبوت التواليات مهما في وظائفها ، ويكون التغيير فيها في بعض الأحيان تأثير في وظيفتها ، وذلك ان التغيير يمكن ان يغير التركيب الثلاثي (3D structure) الذي يكون مهما في أداء الوظائف خاصة اذا كان التغيير في الموقع الفعال او مواقع الارتباط (8) . اما التغييرات في المناطق غير الثابتة تكون محتملة ما لم تكون مؤثرة في تركيب البروتين او وظيفته لذلك فان 50-80 % من التغيرات يمكن ان تتغير دون التأثير في البروتين بشكل مهم ، ولكن من جهة ثانية فان هذه التغييرات والتي تكون عادة ناتجة عن الطفرات هي القوة الدافعة وراء التطور (8,9,10) ، كما انها تكون الأساس في التأقلم للبيئات خاصة المتطرفة مثل معدة الإنسان ، ولكن هذا لا يمنع ان يكون التوجه العام حول حدوث الطفرات هو الدور السلبي فمثلا إدخال ثملات مشحونة الى المواقع المدفونة من البروتين ستؤدي الى كسر صفائح بـا وبالتالي التأثير بشكل كبير في النمط المظهري (8) لذلك فان العديد من البروتينات لا تحتاج الى حوامض امينية كبيرة السلسلة الجانبية مثل التربتوفان كما في البروتينات المسجلة في هذه الدراسة وذلك لانها تؤثر في التركيب النهائي للبروتين (5) ، وتوجد برامج خاصة لتحديد مثل هذه الحالات باستعمال مصفوفات خاصة (10). وقد أسفرت الدراسة الحالية عن ان الحوامض الامينية وتعدادها في البروتينات عن وجود نمط معين من الاحتواء والتوزيع اثر في نقاط تعادلها الكهربائية (pI) كما موضح في الجدول (1) ، وقد لوحظ غياب كل من الحامض الاميني الستئين والميثايونين والتربتوفان كما موضح في الشكل التالي (شكل 2) لسم CagA .

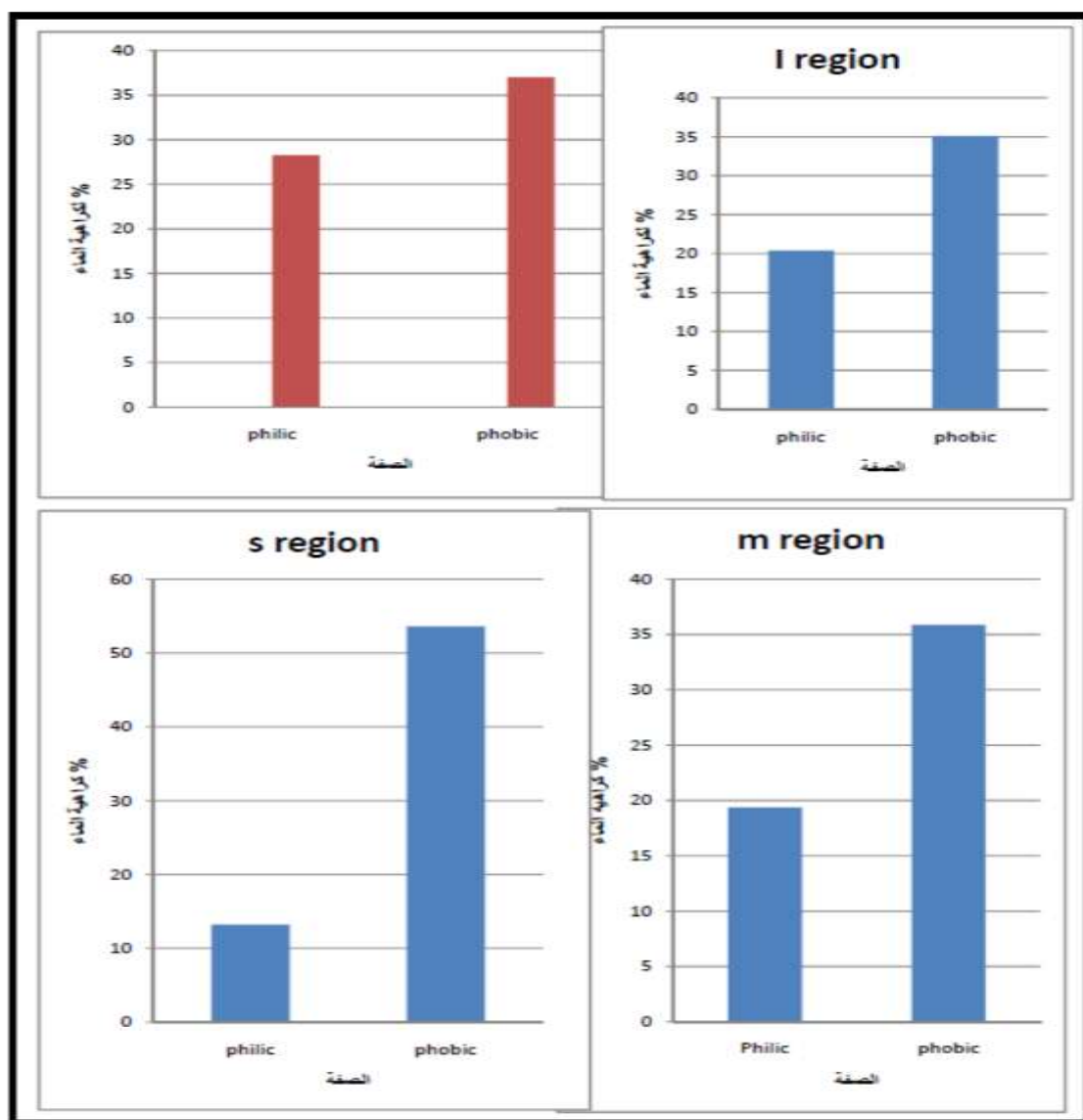
وأكثر الحوامض وجودا هي اللايسين (K) والألنن (A) والاسبارتات (D) المحبة للماء . وخلا من الحامض الاميني الستئين الذي يكون مهما في طوي البروتينات خارج الخلايا (11) وبما ان السم يحقن بنظام TSS4 لذلك لا يحتاج الى وجود الستئين .

اما السم VacA فتوزيع الحوامض الامينية يمكن تلخيصها بغياب الستئين من المنطقة البينية والمتوسطة (i, m) على خلاف منطقة الإشارة (s) يوجد فيها الستئين . واختلاف وجود الحوامض الامينية وبصفتها المختلفة يؤثر في صفة كراهية ومحبة الماء (Hydrophobicity , Hydrophilicity) ، لذلك سجلت هذه الصفة للبروتينات قيد الدراسة والنتائج موضحة في الشكل (3)



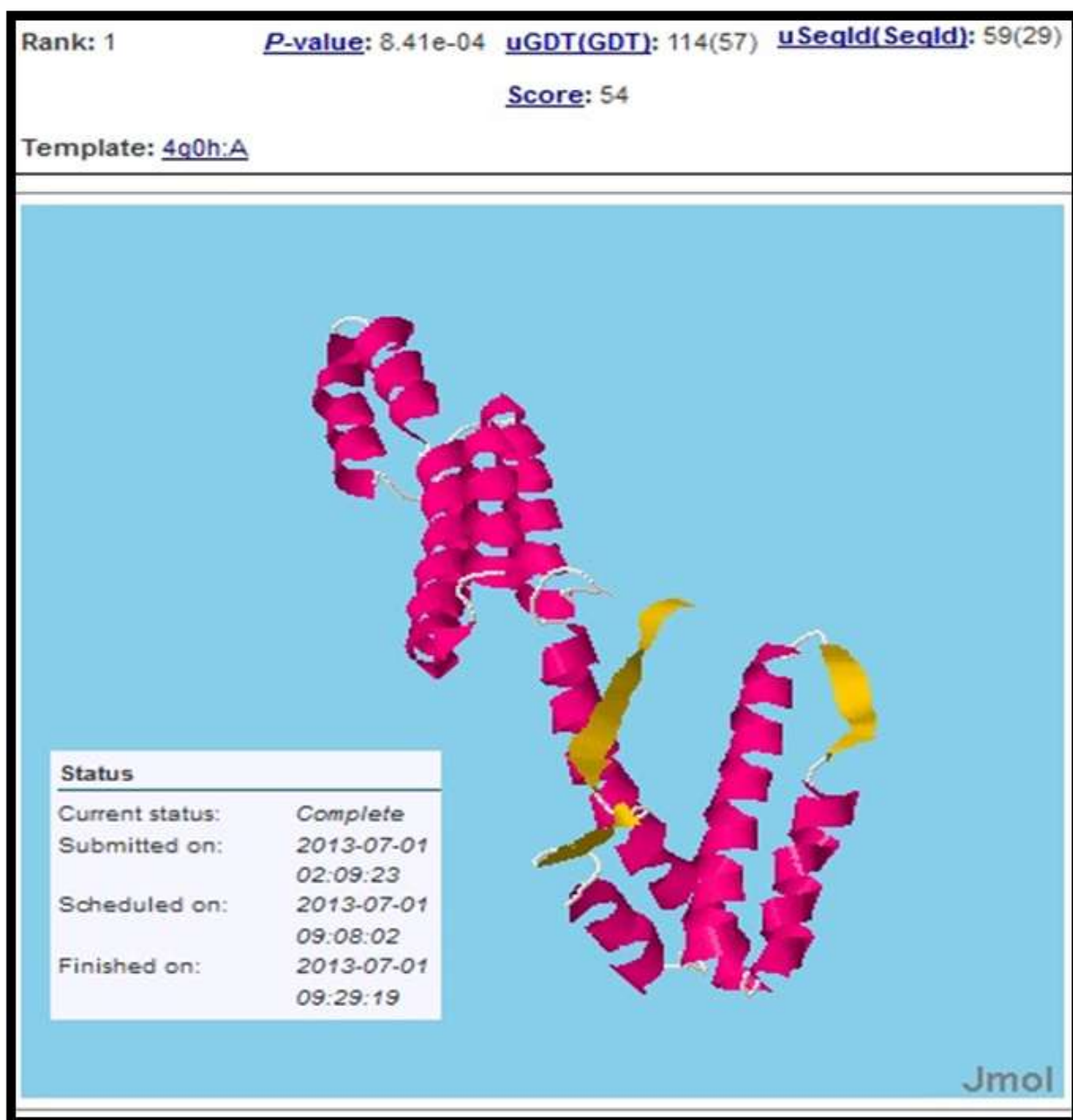
شكل 2 : النسب المئوية للحوامض في بروتين سم جين CagA

والملاحظ ان صفة كراهية الماء هي الغالبة على البروتينات . وتختلف الحوامض الامينية في ميلها للاندماج في التراكيب الثانوية للبروتين (11) لذلك تم تحديد التركيب الثلاثي لكل البروتينات قيد الدراسة للتعرف على طبيعة البروتينات .



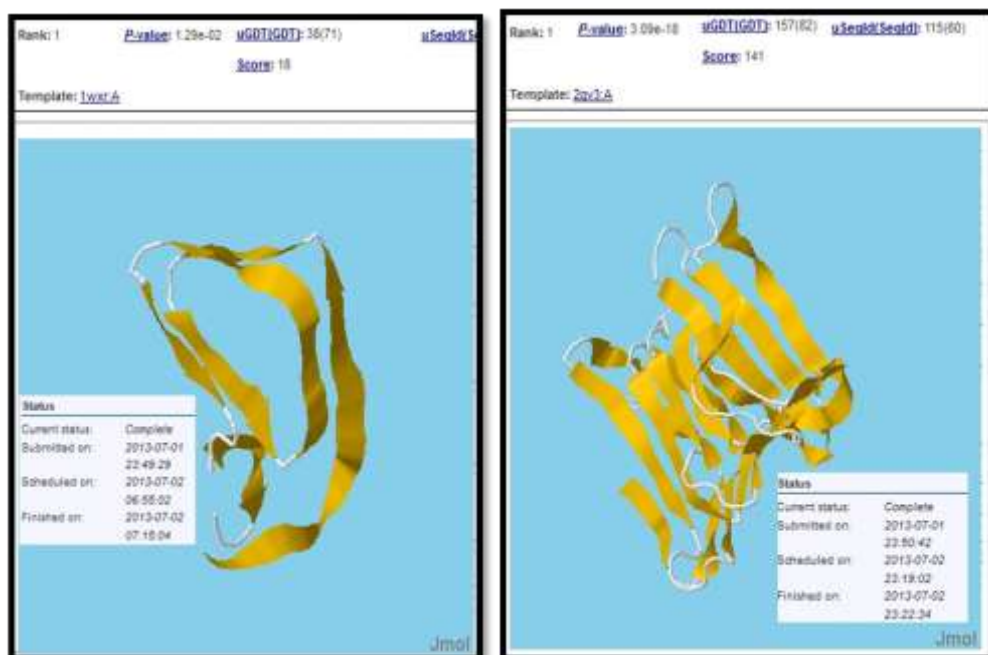
شكل 3 : درجات كراهية الماء للتواليات البروتينية للسموم

وقد وجد ان بعض بروتينات CagA (AFT91240 , AFT91248) قد غابت فيها صفائح بنا في حين سجلت في جزيئات أخرى التي وصلت أعلاها في التوالي AFT91236 ، وفيما يخص حلزونا ألفا (α helices) فكانت منتشرة في الجزيئات جميعا بشكل متواصل او متقطع ووصل عدد الأخيرة في بعضها الى 9 حلزونات كما في AFT91249 و AFT91241 ، والشكل (4) يوضح احد هذه التراكيب.



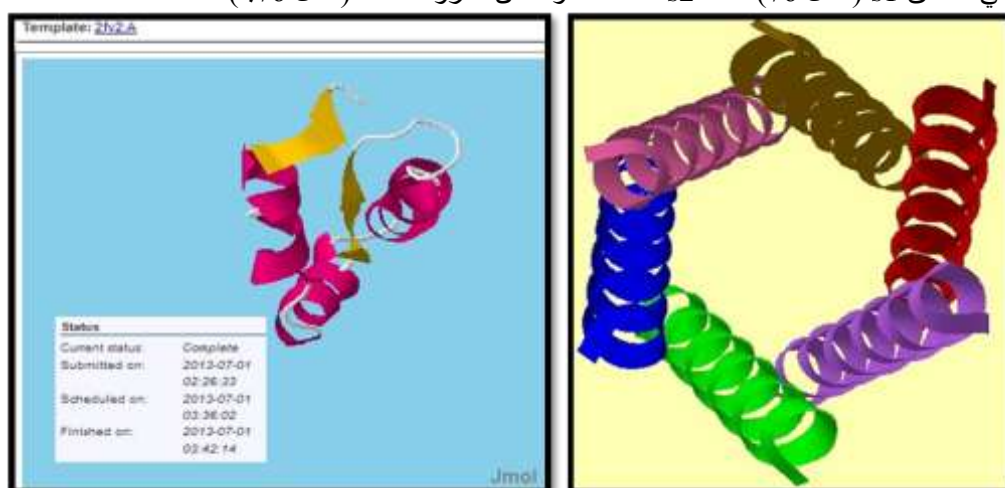
شكل 4 : التراكيب الثانوية لسم جين CagA

والدراسات سموم جين CagA من سلالات أخرى تشير الى ان اللب Core يتكون من صفائح بيتا وتثبت بدومينات حلزونا ألفا ، وتكون صفائح بيتا ضرورية لنقل السم (2) .
 اما في جزيئات السم VacA فاختلفت الصورة ، فالترتيب للمناطق البينية والمتوسطة (i,m) لم تظهر فيها الحلزونات واقتصرت التراكيب على صفائح بتا كما موضح لبعضها في الشكل الآتي (شكل 5 للمنطقة المتوسطة ، للمنطقة البينية).



شكل 5 : تركيب سم جين VacA الأيمن المنطقة الوسطى m region ، الأيسر المنطقة البينية I region

في حين أظهرت منطقة الإشارة الصغيرة التي لم يتجاوز عدد الحوامض الامينية فيها 71 وجود 2-5 من الحلزونات و 1-2 من صفائح بيتا في مناطق s1 (شكل 6/أ) ، اما s2 فكانت مكونة من حلزونات ألفا (شكل 6/ب)



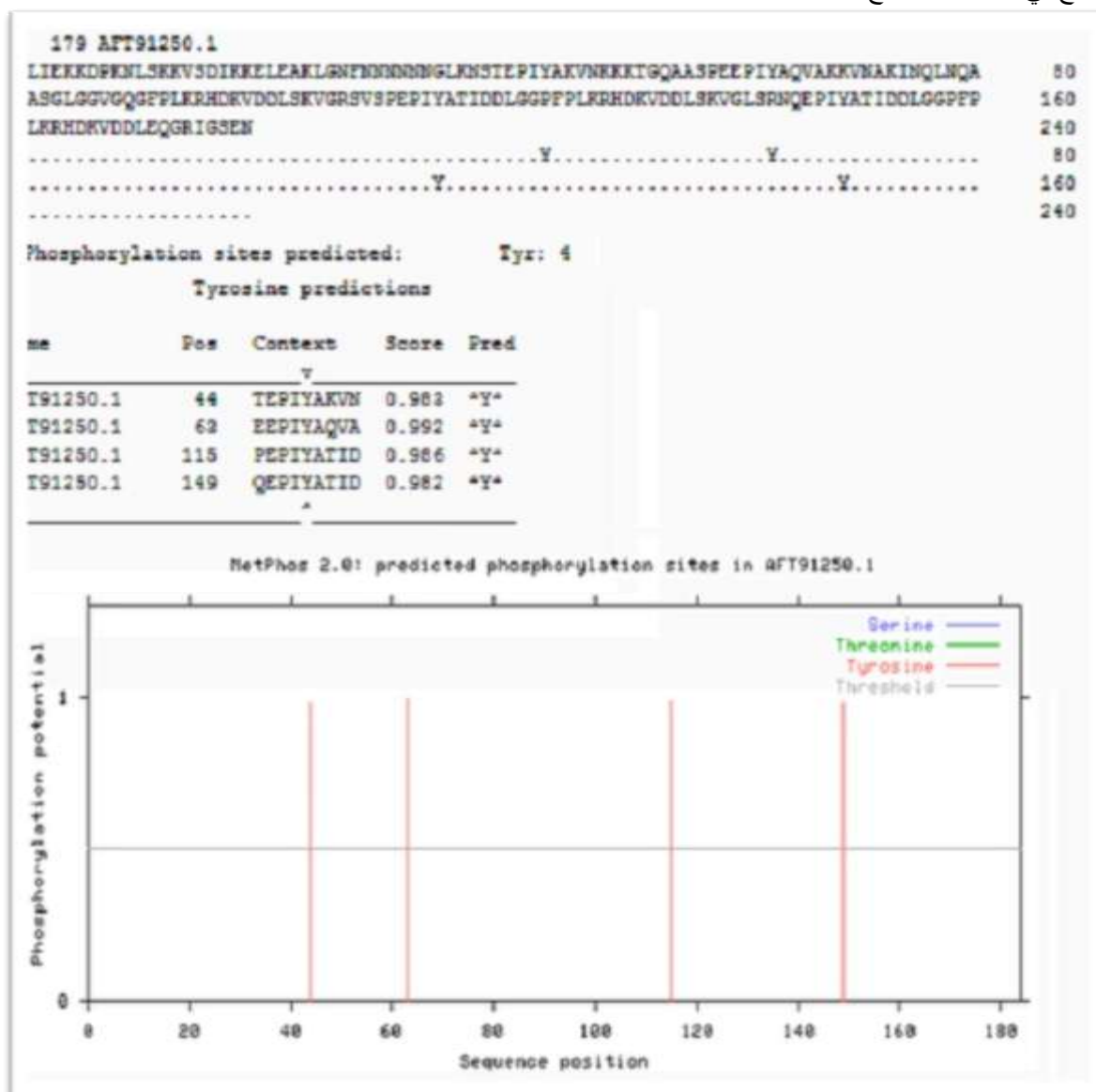
شكل 6 : التراكيب الثانوية لمنطق الإشارة : الأيمن s2 ، الأيسر s1

ومن المعروف ان المنطقة الوسطى (m) تكون مسؤولة عن الارتباط الى خلايا طلائية محددة والتي ستعاني من تكون الفجوات ولذلك ربما كانت بروتيناتها اقل كراهية للماء كما موضح في الشكل (3) المذكور آنفا (1) . والمناطق البينية هي التي تؤثر في شدة الضراوة (1) . ووجود مناطق من النوع s2 قليلة في العالم وفي الدراسة الحالية بلغت نسبتها 12.5% لان مرضى الاصابة ببكتريا *Helicobacter pylori* هم مجموعة منتخبة وهم ممن يعانون من أعراض واضحة، وتكون منطقة (s) مسؤولة عن تصدير السم Protoxin عبر الأغشية (3) لذلك يتوقع ان تكون ذات كراهية عالية للماء كما موضح في الشكل (3) . وتعمل كل من المناطق s1,s2 بشكل متضاد ، اذ تكون الثانية غالبة لتأثير s1 ، مما يجعل البكتريا في صراع الحياة وإجراء عمليات التأشبب الواسعة خاصة تحت الاجهادات (12).

ولغرض ملاحظة تغيير او حذف بعض الحوامض الامينية في فعالية (سمية) البروتينات تم تحديد السمية باستعمال البرامج الخاصة مثل BTXpred فكانت كل تواليات VacA مسجلة على انها سموم خارجية (بالنسبة للبكتريا) وتؤدي الى تكوين الفجوات ، واحدى هذه الدراسات اشارت الى حذف الثمالات من 9-17 حامض أميني من الطرف الاميني لقطع s1 تؤدي الى إلغاء السمية (12) ولكن هذا لم يحصل مع التواليات قيد الدراسة ، وذلك ربما لانخفاض حساسية البرنامج او عدم إدراج مثل هذه الحالات في قواعد البيانات التي يعتمد عليها وان مثل هذه الدراسة تحتاج لدراسات مختبرية .

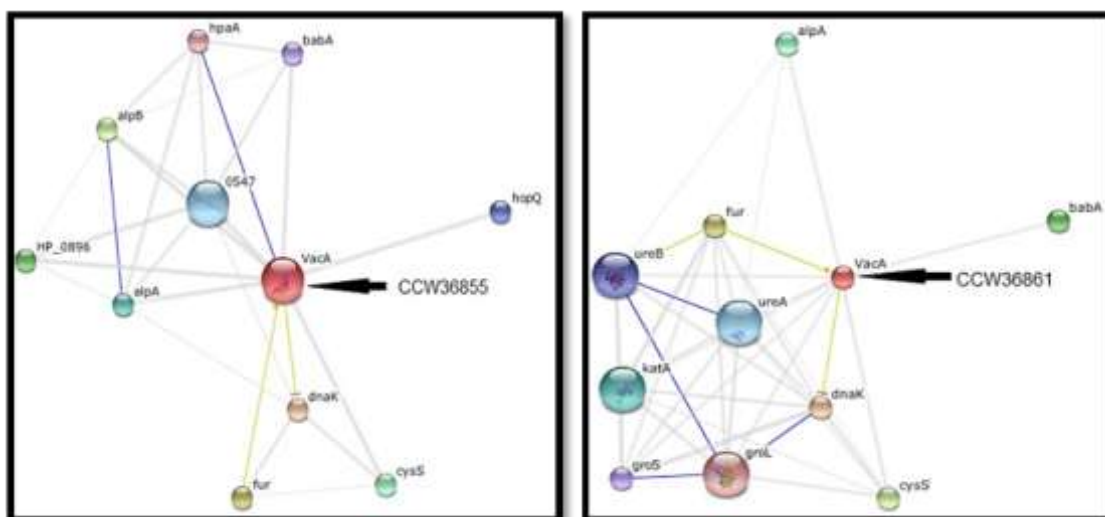
نظرا لكون فعالية سم CagA تعتمد على فسفرة التايروسين في EPIYA (13,14) لذلك تم دراسة فسفرة هذه الثمالات وإمكانية استبدالها بحوامض امينية أخرى من مجاميع خاصة ، الشكل (7/أ) يوضح فسفرة إحدى جزيئات السم (AFT91250)

الحاوية على أربع قطيقات EPIYA وتتم الفسفرة على الحامض الأميني التايروسين ، وعند إضافة ثمالة تايروسين في مواقع مختلفة (*In Silico* insertion OR substitution) لم يلحظ تأثيرا اذ استمرت الفسفرة فقط للتايروسين الموجد ضمن EPIYA كما موضح في الشكل 7/أ،ب،ج.

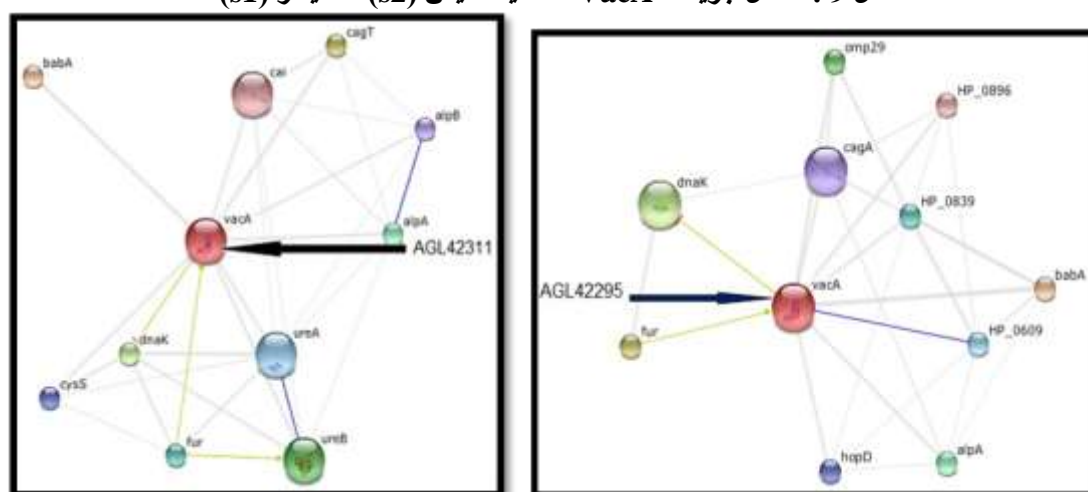


شكل 7 / أ : فسفرة السم CagA عند الثمالة التايروسين في القطيفة EPIYA

وعند استبدال التايروسين فيها بالسيرين الذي يمكن ان يفسر ، أظهرت النتائج إمكانية فسفرة EPISA وان اضافة ثمالات Y في مواقع أخرى لم يكن بالإمكان فسفرتها مما يشير الى أهمية البيئة الموضعية المتوفرة للفسفرة عند وجود التايروسين داخل قطيفة EPIYA . اما مكونات القطيفة الأخرى مثل البرولين الصغير الحجم بالكلايسين لم يؤثر في فسفرة Y وكذلك الحال عند استبدالها بحامض أميني كبير مثل التربتوفان (W).



شكل 9 : تداخل جزيئات VacA المحلية الأيمن (s2) ، الأيسر (s1)



شكل 10 : تداخل سم CagA المنطقة البينية (i) الأيمن ، والمنطقة الوسطى (m) الأيسر

اما تداخلات تواليات المناطق المختلفة من VacA فانه يتأثر بنوع التوالي ، فعند دراسة تأثير اثنين من s2 ومقارنتها بإحدى تواليات s1 كانت التداخلات مختلفة كما في الشكل (9) ، والشكل 10/أ يوضح تداخلات المنطقة الوسطى ، والشكل 10/ب يوضح تداخلات المنطقة البينية مع مكونات الخلية الأخرى .

ان المعرفة المستفيضة بمسببات الامراض في البكتريا وادواتها المشاركة في احداث الامراض يسهل عمليات تصميم الأدوية In Silico drug design وكذلك تصميم اللقاحات الوقائية والتي تقصر الطريق أمام اكتشاف الأدوية الجديدة خاصة للبكتريا متعددة الفعاليات ومتقلبة مثل *H. pylori*.

References

1. Chung , C ., Olivares , A ., Torres , E ., Yilmaz , O ., Cohen , H ., and Perez-Perez , G. (2010) . Diversity of VacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. Journal of Clinical Microbiololgy , 48 : 690-696.
2. Kaplan-Türköz , B ., Jiménez-Soto , L ., Dian , C ., Ertl , C., Remaut , H ., Louche , A ., Tosi , T ., Haas , R . and Terradot , L. (2012) . Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with $\beta 1$ integrin. Proceeding of Notational Academic Science U S A. 109:14640-14645
3. Atherton , J ., Cao , P ., Peek , R ., Tummuru ,M ., Blaser, M . and Cover , T. (1995) . Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration . Journal of Biological Chemistry , 270 :17771-17777.

4. Letley , D ., Lastovica , A ., Louw , J ., Hawkey , C . and Atherton , J . (1999) . Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. Journal Clinical Microbiology, 37 :1203-1205.
5. Betts , M. and Russell , R. (2003) . Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions . In " Bioinformatics for Genetics ". John Wiley & Sons , Ltd. USA . pp 290- 316 .
6. Kalaf , E . (2012) . Molecular Study for Detection of CagA Genotype of *Helicobacter pylori* from Endoscopic Biopsies of Iraqi Patients . PhD. Thesis , Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies / Univ. of Baghdad, IRAQ .
7. Abo-Almaali (2013). Investigation of VacA Genotypes of *Helicobacter pylori* from Samples in Karbala Governorate. PhD. Thesis, Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies / Univ. of Baghdad, Iraq.
8. Schaefer , C . and Rost , B . (2012) Predict impact of single amino acid change upon protein structure . BMC Genomics , 13 : 1-10 .
9. Ng , C. and Henikoff , S . (2006) . Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function . Annual Reviews Genomics and Human Genetics , 7 : 61-80.
10. Ng ,C. and Henikoff , S. (2001) . Predicting deleterious amino acid substitutions . Research 11 : 863-874.
12. Letley , D . and Atherton , J . (2000) . Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. Journal of Bacteriology , 182 :3278-3280.
11. Berg , J ., Tymoczko , J. and Strye , L. (2002) . Biochemistry . 5th edition C W H Freeman, New York .
13. Amieva, M.R. | El-Omar, E.M. (2008) . Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection . Gastroenterology , 134:306-323 .
14. Argent , R ., Kidd , M., Owen , R., Thomas , R ., Limb ,M ., and Atherton , J . (2004) . Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 127(2):514-23.