

Riflessioni sull'importanza della tossina VacA nella patogenesi autoimmune da H.pylori

Dott. Marco Mancini

Quando il nostro Giulio Bizzozzero osservò per primo dei bacilli elicoidali nel tessuto gastrico correva l'anno 1893; a quel tempo nessuno diede importanza a questi riscontri, perché il dogma della sterilità gastrica non ammetteva profanazioni. Oggi, però, non esistono più dubbi: lo stomaco, dove il pH è 2, può essere abitato in permanenza da microrganismi vivi. L'interesse scientifico di queste scoperte ha promosso una mole incredibile di ricerche, e adesso abbiamo conoscenze sufficienti per affrontare un altro aspetto di questa rivoluzione: che la distinzione fra gastrite A (autoimmune), B (batterica), e C (chimica) può essere impossibile da definire con precisione. Infatti H. pylori ha un ruolo in tutti e tre i tipi di gastropatia. (1)

L'interazione spesso sinergica tra flogosi da colonizzazione e insulto da farmaci non è una sorpresa, ed esistono molti dati a sostegno di questa ipotesi; ma l'aspetto più oscuro e più interessante, invece, è la "misteriosa" relazione che c'è tra l'infezione e i processi autoimmuni, cosa che tratteremo più avanti (il non-self mima il self). (1)

Helicobacter pylori è un microrganismo di recente scoperta; il primo isolamento risale infatti al 1982 ad opera dei neo premi nobel Robin Warren e Barry Marshall. Attualmente è universalmente riconosciuto che H. pylori è la più comune causa di infezioni croniche ad eziologia batterica nell'uomo e rappresenta una delle principali cause di ulcera peptica; numerosi studi, inoltre, hanno dimostrato il ruolo eziologico del microrganismo anche in alcune gravi neoplasie e nella sindrome dispeptica. H. pylori è infatti presente nel 95% delle ulcere duodenali e nel 70 –80% delle ulcere gastriche, nonché in persone clinicamente sane e nei familiari di pazienti infetti. Studi di campo hanno evidenziato che nei paesi in via di sviluppo è presente una sieroprevalenza superiore al 50% dei soggetti testati, mentre nei paesi industrializzati la prevalenza sierologica è inferiore. Inoltre H. pylori è l'unico batterio isolato da carcinomi gastrici dell'uomo ed è stato associato a linfomi gastrici. Tuttavia molti aspetti circa la trasmissione, l'esistenza di possibili serbatoi, la dose infettiva e le tecniche di isolamento a partire da matrici complesse quali gli alimenti, devono ancora essere chiariti. È di questi ultimi anni l'opinione da parte della comunità scientifica che H. pylori possa essere trasmesso attraverso il consumo di acqua e alimenti contaminati; questa ipotesi deriva da numerose evidenze di tipo epidemiologico, dai rilievi di tipo molecolare e dagli isolamenti del microrganismo a partire da diverse matrici alimentari.

È un proteobatterio appartenente alla famiglia Helicobacteriaceae, genere Helicobacter. Attualmente, al genere Helicobacter appartengono ventuno specie in grado di infettare uomo e numerosi animali domestici.

Sono considerati particolarmente patogeni per l'uomo i genotipi di *H. pylori* che possiedono specifici markers di virulenza come il gene *VacA* (che a sua volta può presentare più varianti alleliche, s1/m1, s1/m2 e s2/m2) codificante la citotossina vacuolizzante *VacA* (2),(3),(4). Un altro marker di virulenza è rappresentato dal gene *CagA*, codificante per la corrispondente proteina *cagA*; la funzione specifica di questa proteina non è nota, ma, sicuramente, è associata alla presenza di un maggiore infiltrato infiammatorio ed un aumento del rischio di sviluppare gastriti, malattie peptiche e neoplasie della mucosa gastrica. Di conseguenza, esisterebbero due fenotipi di *H. pylori*: ceppi *vacA*+/*cagA*+, indicati come tipo I, in grado di produrre la citotossina *VacA* e la proteina *CagA* e ceppi *VacA*-/*cagA*-, indicati come tipo II, incapaci di esprimere la due proteine. A seconda, quindi, del tipo di *H. pylori* si avrà un decorso diverso della patologia, che potrà manifestarsi con ulcera gastrica o originare soggetti asintomatici. I ceppi di tipo I sembrano maggiormente ulcerogeni; esistono, tuttavia, nell'ambito dell'infezione da *H. pylori*, forme intermedie di virulenza, legate alla presenza o meno delle varie combinazioni alleliche.

Ne consegue che per un più approfondito giudizio sanitario circa la presenza di *H. pylori* negli alimenti, sarebbe opportuno genotipizzare i ceppi isolati.

In merito alla tossicità dei ceppi di *H. pylori* legati alla presenza della tossina *VacA* c'è da aggiungere quanto segue:

- Esiste uno stato genotipico di fondo denominato *VacA* il quale codifica le due citotossine *VacA* e *CagA* attraverso la presenza di tre famiglie di alleli: **S1a, S1b, S2**
- La **S1a**, quando presente, **aumenta fortemente il rischio di sviluppo di carcinoma gastrico**
- La **S1b**, di cui è ancora dubbio il ruolo nella genesi dei disturbi gastrici
- La **S2**, la quale **riduce fortemente il rischio di sviluppare il carcinoma gastrico**

A tutto questo si devono aggiungere altre 2 famiglie di alleli presenti nella regione media di *VacA*: **m1 e m2**.

Solo l'associazione **S1a elabora la citotossina *CagA***, e quindi capace di generare ulcera duodenale nell'ospite; **l'associazione S2-m2 non elabora mai, al contrario, tale tossina. Il 95% dei soggetti affetti da disturbi peptici, presenta l'associazione S1a/m1**, a prescindere dal fatto che possano avere gastrite cronica, ulcera peptica o cancro dello stomaco.

Tutti i ceppi di *H. pylori* presentano il gene *VacA* che codifica per la tossina omonima, ma si è visto che solo il 50% dei ceppi infettanti presenta la citotossina *VacA*. Al contrario il gene *A* citotossina associato (*CagA*) è presente in tutti i ceppi *CagA* positivi, e la sua presenza starebbe a significare

un maggior grado di infiammazione locale legato al batterio. Questo evento sarebbe confermato dall'aumento della produzione autoctona di citochine a carattere pro-infiammatorio come IL-2, IL-6, ma specialmente IL-8.

L'habitat di H. pylori è rappresentato dalla mucosa gastrica dell'uomo. Inoltre, alcuni Autori hanno ipotizzato che esistano serbatoi animali e, di conseguenza, che esista la possibilità di trasmissione di tipo zoonosico; tuttavia, ad oggi non sono stati ancora individuati con certezza i possibili reservoirs. Ad avvalorare l'ipotesi dell'esistenza di questi ultimi, il riscontro della presenza di H. pylori nella mucosa gastrica di bovini, suini e equini e nel latte di ruminanti. Inoltre, similmente a quanto si verifica per altri patogeni enterici, H. pylori potrebbe contaminare le carcasse durante la macellazione degli animali destinati alla produzione di carne.

H. pylori è l'agente eziologico della gastrite cronica e dell'ulcera gastrica e duodenale. L'infezione da H. pylori è stata, inoltre, correlata con lo sviluppo di linfoma gastrico non-Hodgkin's e al MALToma, disordine di tipo linfoproliferativo del tessuto linfoide della mucosa gastrica (MALT).

La capacità di colonizzare l'ostile ambiente gastrico e di sopravvivere in stretto contatto con la mucosa è condizione indispensabile affinché H. pylori, possa provocare direttamente o indirettamente, le patologie della mucosa del tratto digestivo superiore sopra menzionate. Oltre che dalle capacità "colonizzatrici" del batterio, il tipo di patologia correlata dipende da numerosi fattori sia ambientali che intrinseci all'organismo ospite. Tra i principali fattori di colonizzazione e virulenza batterica si annoverano l'attività ureasica, la mobilità, la capacità del batterio di aderire in modo specifico all'epitelio gastrico e la resistenza di H. pylori alla reazione immunitaria dell'ospite. L'ureasi, oltre che importante fattore di colonizzazione, rappresenta un importante fattore di istolesività. Funzione essenziale dell'ureasi è quella di scindere l'urea in bicarbonato e ioni ammonio, così da consentire al batterio di neutralizzare il pH acido dello stomaco e di avere una fonte di azoto per la sintesi di proteine. Lo ione ammonio di per sé, non è tossico, ma lo diviene tramite la reazione con l'acqua che porta alla formazione di ioni idrossido, molecole con patogenicità diretta sulle cellule della mucosa gastrica. Inoltre, l'ammoniaca contribuisce alla sopravvivenza del microrganismo riducendo l'attività battericida dei polimorfonucleati e monociti, mediante l'inibizione dell'acidificazione durante la fagocitosi. La virulenza dei ceppi di H. pylori, l'età di acquisizione dell'infezione e la sua durata, la risposta immunitaria, così come i meccanismi di resistenza e di riparazione della mucosa e la capacità secretiva di acido sono tutti elementi interagenti in un complesso e variabile gioco di forze dal quale dipenderanno in definitiva tipo e severità del danno gastroduodenale, cioè lo spettro della patologia H. pylori-correlata.

L'infezione è contratta spesso in età pediatrica e si pensa che abbia un ruolo nel determinismo di altre patologie extragastriche *H. pylori*-associate. La presenza di una elevata incidenza di **infezione gastrica nei soggetti affetti da cardiopatia ischemica** è stata una delle prime osservazioni suggestive della presenza di una associazione tra infezione gastroduodenale da *H. pylori* e patologie extradigestive. Di recente acquisizione è la **correlazione tra l'infezione gastrica da *H. pylori* e cefalea**; tra le varie forme osservate, **l'emigrania senza aura è risultata essere la forma di più frequente riscontro nei pazienti infetti**. Nell'ambito delle patologie dermatologiche, sono numerosi i pazienti affetti da **orticaria rosacea *H. pylori* positivi** che hanno mostrato scomparsa della sintomatologia cutanea in seguito all'eradicazione dell'infezione. **Anemia sideropenica ed infezione da *H. pylori*** è un'altra associazione proposta da alcuni autori. Recenti studi hanno dimostrato inoltre un'elevata **prevalenza dell'infezione gastrica da *H. pylori* in soggetti affetti da patologia tiroidea di tipo autoimmune**; i ceppi di *H. pylori* maggiormente isolati in questa condizione patologica sono risultati essere in grado di produrre la proteina CagA e pertanto dotati di una maggiore azione patogena. È stata, infine, descritta la presenza di una associazione tra infezione da *H. pylori* e ridotta crescita nei bambini, nonché con l'insorgenza di trombocitopenie autoimmuni (AIT), cosiddette "idiopatiche".

Le patologie determinate dall'infezione da *H. pylori* sono a decorso cronico.

Numerosi studi hanno dimostrato che *H. pylori* è un microrganismo ubiquitario; infatti circa il 50% della popolazione mondiale risulta infetta. Tuttavia, la fascia di età più a rischio, la prevalenza dell'infezione e i possibili sintomi e sequele delle patologie indotte da *H. pylori* variano drammaticamente a seconda che si parli di paesi industrializzati o paesi in via di sviluppo.

L'infezione da *H. pylori* colpisce prevalentemente i bambini al di sotto dei 10 anni di vita in particolar modo nei paesi sottosviluppati, per poi **persistere come infezione cronica in età adulta**.

Le modalità di infezione non sono a tutt'oggi completamente chiare ma si suppone che questa venga assunta con diversi meccanismi. Tra le teorie proposte, quella del ciclo oro-fecale è tra le più accreditate: come conseguenza della fecalizzazione ambientale è possibile ammettere che *H. pylori* possa sopravvivere nell'ambiente esterno e contaminare così alimenti ed acqua. Infatti diversi Autori sostengono che *H. pylori* possa essere considerato un vero e proprio patogeno a veicolo alimentare, basandosi sulle seguenti constatazioni:

- nell'ambito di ristretti gruppi familiari la prevalenza dell'infezione è elevata; questo aspetto suggerisce che il germe possa essere trasmesso

indirettamente attraverso il consumo degli “stessi alimenti alla stessa tavola”.

- *H. pylori* è stato isolato dall'acqua potabile e di irrigazione e si suppone che vegetali e diversi alimenti di origine animale, come latte ovino e bovino, dai quali è stato isolato, possano fungere da veicolo dell'infezione.
- *H. pylori* è in grado di sopravvivere in matrici alimentari complesse come il latte ed in alimenti “ready to eat” (alimenti pronti al consumo che non necessitano di ulteriori trattamenti termici).
- infine, essendo tassonomicamente vicino a *Campylobacter jejuni*, tipico patogeno emergente a veicolo alimentare, alcuni AA. considerano sovrapponibili le modalità di trasmissione di questi due microrganismi all'uomo, considerandoli entrambi, “foodborne pathogens”.

Secondo numerose ricerche *H. pylori* non è in grado di replicare negli alimenti, ma riesce a sopravvivere per tempi lunghi in alimenti con **bassi valori di pH e aw elevata** (acqua libera utilizzata nella conservazione dei cibi legata a basse concentrazioni di glucosio che, come il sale, ma in misura molto più blanda, favorirebbero l'inibizione alla crescita di microrganismi), come carne e latte. Ad avvalorare, ulteriormente, l'ipotesi che gli alimenti siano una possibile fonte di infezione per l'uomo, *H. pylori* è stato isolato dal latte ovino e dal latte bovino.

In Giappone, studi condotti riguardo la presenza del microrganismo nell'ambiente, hanno rilevato il DNA batterico nell'acqua dei fiumi e dei laghi, negli escrementi di mosche e nelle feci di bovini. La presenza del DNA di *H. pylori* in questi campioni non confermò la sua vitalità in quanto i ceppi non furono isolati, ma confermò che l'acqua e altre sorgenti ambientali potessero essere, al contrario di come si pensava in un recente passato, veicolo di infezione.

Successivamente ad alcuni esperimenti, che portarono alla constatazione che *H. pylori* sopravvive nell'acqua potabile per circa 4 giorni e che vi persiste per oltre 7 giorni sotto forma di VNC (forme di resistenza); diversi Autori inoltre hanno isolato il microrganismo dall'acqua. Sebbene questi siano gli unici dati disponibili, certamente, rafforzano la teoria secondo la quale l'acqua possa fungere da veicolo di infezione, in particolar modo nei paesi in via di sviluppo, dove il trattamento delle acque potabili spesso è insufficiente.

Sono state prese in considerazione altre modalità di trasmissione come ad esempio la via iatrogena (attraverso l'utilizzo di endoscopi non adeguatamente sanificati) e persona-persona attraverso il ciclo oro-orale (*H. pylori* è stato infatti isolato anche dalla placca dentaria e dalla saliva). Inoltre, particolari consuetudini, tipiche delle popolazioni dei paesi in via di sviluppo (premasticazione del cibo per i neonati), possono contribuire alla diffusione di

questa infezione avallando l'ipotesi della trasmissione attraverso il ciclo oro-orale.

Quello che preme sottolineare in questo lavoro, è la possibilità che, la presenza di detta citotossina (*VacA* di 95kD), sia spesso alla base nella genesi dei disturbi autoimmuni indotti dal batterio. L'interazione con l'ambiente acido-peptico dello stomaco comporta una sorta di aggressione verso tale tossina che in seguito all'azione di specifiche proteasi locali subisce una scomposizione in due frazioni principali le quali danno luogo successivamente ad importanti effetti locali e generali. La prima è un dominio 37kD (p37) essenziale per l'attività vacuolizzante, la seconda è un dominio 58kD (p58) essenziale per il legame al recettore specifico; esiste infine un dominio denominato "autotrasportatore" che guida la citotossina *VacA* attraverso la membrana esterna del batterio. Quest'ultimo viene successivamente rimosso attraverso uno specifico clivaggio proteolitico. In questo modo la *VacA* può rimanere adesa alla superficie esterna del batterio o rilasciata nel mezzo interno. In acqua la *VacA* monomerica, ha una forte tendenza a formare una struttura oligomerica a forma di fiore: questa nuova configurazione presenta una scarsa attività vacuolizzante (5), (6), (8).

La *VacA* in coltura, presenta un numero limitato di siti ad alta affinità a cui si lega, mentre sono svariati quelli a bassa affinità. Tra i primi quelli più importanti sono la proteina fosfatasi-tirosina β , e α , (8), (9), una proteina GPI-ancorata, più spesso associata ai rafts (10), e un recettore EGF, mentre i siti non saturabili a bassa affinità sembrano essere proprio i lipidi, dato che la *VacA* si lega ai liposomi e alla doppia membrana lipidica aumentandone la permeabilità ionica (12) (16). La forma monomerica della *VacA* tende ad inserirsi all'interno delle membrane dove forma dei canali esamerici anione-specifici (7) (13) (17). Tali canali si raggruppano anche all'interno della membrana plasmatica cellulare incrementando, in tal modo, la permeabilità verso piccoli anioni, inclusi cloruri, bicarbonati e piruvati con conseguente depolarizzazione di membrana (18).

La *VacA* forma dei canali anione-specifici anche a livello della zona apicale delle cellule epiteliali della mucosa gastrica (19). Questo suggerisce in prima istanza che, tale attività della *VacA* può permettere la permanenza dell'*H. pylori* a livello apicale delle cellule, permettendogli di raccogliere anioni come bicarbonati e piruvati, che sono entrambi nutrienti e al tempo stesso tamponi del pH (20). La *VacA* sembra agire a livello della membrana apicale incrementando la via paracellulare della permeabilità trans-epiteliale agli ioni essenziali per *H. pylori*, come il ferro e il nickel, e di piccoli zuccheri (21). Sebbene il meccanismo molecolare che sta alla base di questa attività non sia stato ancora ben chiarito, il suo significato in termini di sviluppo della crescita batterica è chiaro; in particolare se consideriamo che lo strato di muco che tappezza e protegge l'epitelio dello stomaco non è permeabile ai protoni e a

piccole molecole nella direzione lume-mucosa (20). Pertanto, la *VacA* può permettere all'*H. pylori* di permanere in un ambiente povero di nutrienti e con un pH decisamente neutro.

Dopo il legame di membrana e la formazione dei cosiddetti pori, la *VacA* viene lentamente endocitata e raggiunge la membrana che limita il comparto endosomiale (22) (23). I vacuoli provengono dagli ultimi endosomi e lisosomi e richiedono l'attività della pompa protonica (una pompa di tipo vacuolare: *v-ATP-asi*) (24) (25). Durante la sua permanenza all'interno della cellula e del percorso endocitario, si ritiene che la *VacA* mantenga la sua attività dei canali anionici, dato che questo non viene attaccato dal pH acido del lume degli endosomi stessi (14) (15). Tutte le possibili evidenze indicano che la combinazione delle due azioni, la *v-ATP-asi* e del canale anionico della *VacA*, aumenta la pressione osmotica all'interno del comparto endosomiale che aumenta, a sua volta, la formazione dei vacuoli (20). In questo modo la *VacA* aumenta il rilascio della idrolasi lisosomiale nel mezzo extracellulare ed inibisce l'idrolisi di tutte le molecole che sono normalmente degradate all'interno degli ultimi endosomi e lisosomi, come ligandi, recettori e antigeni (26).

Il settore che processa l'antigene legato alle cellule presentanti l'antigene (APC), è omologo agli ultimi endosomi (27). È provato che la *VacA* influenza fortemente la processazione di un modello di tossina tetanica da parte delle cellule umane presentanti l'antigene tanto che la proliferazione delle cellule T-specifiche viene fortemente ridotta (28). Questo ha portato a pensare che la *VacA* possa esercitare un'azione immunosoppressiva locale inibendo la presentazione di antigene all'interno della mucosa gastrica (28). Dato che la *VacA* vacuola quasi tutti i tipi di cellule, tale inibizione non è sicuramente antigene specifica. L'attività immunosoppressiva della *VacA* non è stata testata in vivo, ma è in linea con la ricerca scientifica che l'infezione da *H. pylori* nei topi infettati con virus vaccinico riduce la risposta-vaccinica specifica T citotossica dei linfociti e prolunga l'infezione virale (29). Due lavori (30) (31) sono a supporto sull'attività immunosoppressiva della *VacA*, ma il meccanismo che essi descrivono coinvolge un meccanismo diretto sulle cellule T piuttosto che le cellule presentanti l'antigene. Essi mostrano che la tossina inibisce fortemente la proliferazione delle cellule T indotta da un'attivazione policlonale. L'attivazione e la proliferazione dei T linfociti è fortemente promossa dall'attivazione della IL-2 (interleuchina-2) in parallelo con l'espressione sulle cellule di superficie del recettore ad alta affinità per l'IL-2. La *VacA* ha mostrato di essere in grado di inibire questo anello autocrino come anche è ridotta la produzione dell'IL-2 e del suo recettore (31). Boncristiano et al. (31) hanno notato che il dominio terminale 58kD-COOH terminale della *VacA* (p58) che manca del dominio NH2-terminale p37, richiesto per la formazione dei canali, è anche inibitorio. Queste sono le azioni

che coinvolgono l'attività dei canali anionici della VacA nella inibizione delle cellule T. Infatti, il dominio p58, è privo di attività vacuolare (32) (33).

Il legame della VacA a specifici recettori dipende dalla sua concentrazione e dai vari tipi di cellule. Ad alte concentrazioni, questa si lega direttamente ai lipidi. In aggiunta, attraverso il distacco locale del recettore proteico, VacA si inserisce all'interno del doppio strato lipidico, un passo che risulta essere irreversibile a causa della sua tendenza a formare canali anione-specifici esamerici. I differenti tipi di legame sono alla base della successiva risposta cellulare (31). La moderata infiammazione localizzata a livello della mucosa gastrica causata dalla presenza dell'*H. pylori*, promuove il rilascio dai tessuti di nutrienti necessari per la sua crescita, e questa necessità, apparentemente non può che seguire questa via, data la stretta forte limitata permeabilità dello strato di muco dello stomaco e del rivestimento epiteliale. D'altro canto, una persistente infezione di mucosa può trarre beneficio da una inibizione della risposta immune locale. Pertanto differenti molecole di *H. pylori* hanno un'attività pro-infiammatoria, lo stesso fattore di virulenza, la VacA, risulta essere contemporaneamente pro-infiammatorio e immunosoppressivo in funzione del tipo di cellule a cui si lega (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42).

Esperimenti sul trasferimento del DNA hanno mostrato che il frammento NH₂ terminale della proteina che, a sua volta, contiene il frammento 37kD più 110 aminoacidi del frammento 58kD, è necessario e sufficiente per l'azione vacuolizzante (43). D'altro canto, la p58 prodotta da *H. pylori*, si lega alle cellule epiteliali con una cinetica simile alla holotossina, ma manca dell'attività vacuolante e, infatti, non entra nella cellula (44). L'attivazione delle cellule T è legata all'aumentata espressione del loro markers di superficie, e cioè il CD69; questo, a sua volta, è fortemente iper-regolato dal legame col TCR-CD3. Si è visto che l'azione della VacA riduce fortemente l'espressione del CD69 indotta dal CD3 sulla superficie delle cellule T. L'incubazione con la sola p58, riduce anch'essa l'espressione del CD69. La presenza pertanto della VacA di *H. pylori* riduce fortemente l'espressione del CD69 su entrambe le linee: CD4 e CD8. Anche se, il blocco degli ioni calcio da parte della VacA è sufficiente a spiegare l'inibizione dell'attivazione delle cellule T, il fatto che la p58 inibisce anche l'espressione del CD69, indipendentemente dalla formazione dei canali anionici e dall'influsso del calcio, indica che la vacA deve avere due attività indipendenti su queste cellule (44). L'attivazione della tirosin-chinasi (PTKs), si è visto che è presente anche a livello dei neutrofili che dei macrofagi stessi, e questo comporterebbe l'attivazione e il mantenimento dell'attività infiammatoria a livello gastrico con conseguente cronicizzazione della malattia. **Il segnale legato alla PTK è generalmente innescato dai recettori di superficie cellulare sebbene esista un forte mimetismo attraverso un cross-legame (sui rafts lipidici) con la tossina del colera al ganglioside GM1, che ugualmente può mimare il segnale del TCR (recettore cellulare T)** (45) (46). Entrambi questi meccanismi possono giocare un ruolo

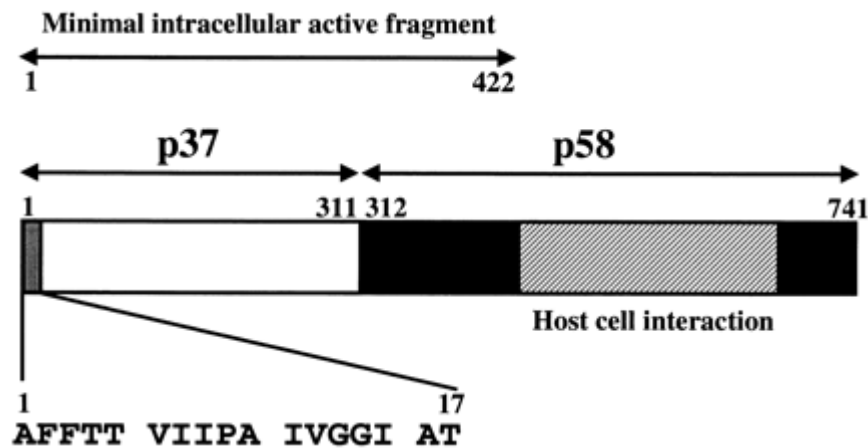
nell'attivazione, da parte della VacA, sull'attività della PTK. Sta di fatto che, l'infezione da H. pylori induce una forte stimolazione della risposta immune dell'ospite che, comunque, è spesso insufficiente a prevenire la colonizzazione delle nicchie gastriche. La malattia è spesso associata ad una risposta Th1 nella mucosa gastrica, e questo sembrerebbe il maggiore responsabile dell'infiammazione gastrica caratteristica che si presenta nella malattia da H. pylori (47). La VacA, a sua volta, interferisce nella presentazione di antigene nelle cellule B attraverso il blocco del normale processo proteolitico di internalizzazione dell'antigene e presentazione dei peptidi risultanti attraverso l'MHC (48). Questo sembrerebbe spiegare come avverrebbe, durante l'invasione, l'evasione dalla risposta immune.

Le due frazioni che si ricavano dal clivaggio proteolitico della VacA (95kD) nella 37kD (responsabile dell'azione vacuolare sulle cellule epiteliali gastriche) e nella 58kD (che si lega invece al recettore specifico, il ganglioside GM1), sembrano rimanere ancorate alla struttura oligomerica, e questo suggerisce una forte affinità con le tossine A e B del colera (con riferimento specifico al mimetismo molecolare col recettore GM1 e i rafts lipidici visti sopra) (49).

A conferma di quanto sopra esposto si è visto che mettendo a contatto una miscela di gangliosidi (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3 e GT1b) con la citotossina VacA di H. pylori, si è ottenuta una buona attività neutralizzante su di essa. Tra tutti quello che ha mostrato la maggiore attività di legame e quindi di neutralizzazione è stato proprio il ganglioside GM1. Il lavoro, pertanto, ha mostrato che il legame diretto con i gangliosidi liberi neutralizza fortemente l'attività della tossina di VacA. Questo fenomeno sta diventando oggetto di studio per il prossimo futuro perché attraverso questo meccanismo si sta ipotizzando la possibilità di utilizzare un vaccino costituito da questi gangliosidi, per neutralizzare l'azione citotossica della VacA e quindi la successiva colonizzazione gastrica da parte del batterio (50). D'altro canto, si è visto anche che, la vaccinazione mucosa attraverso il lactococcus lactis che esprime sulla sua superficie esterna l'Ureasi B dell'H. pylori ha permesso di rendere resistenti al batterio ratti sottoposti a tale vaccinazione. Tale somministrazione ha determinato quindi la produzione sierica di elevate quote di IgG specifiche antiU-B e, nelle feci, di IgA altrettanto specifiche (51).

Alla luce dei fatti attuali si può certamente asserire che delle due frazioni della VacA sicuramente la prima, la 37kD è determinante nella genesi della vacuolizzazione delle cellule epiteliali dello stomaco, mentre la seconda, la 58kD, che si lega al recettore GM1, ha forte affinità per i disturbi di origine neuropatica, nonché di mediazione immunologica attraverso la possibilità di un blocco del CD69 e conseguentemente dei fenomeni legati alla processazione dell'antigene stesso che gli permetterebbero, in sostanza, di evadere la risposta immune dell'ospite. L'affinità di legame con il ganglioside GM1 e la suddetta

frazione (58kD), viene condivisa inoltre con altre tossine: in particolare con quella B del colera e con quella del campylobacter jejuni. La presenza di anti-GM1 risulta addirittura predittiva nelle malattie neuromuscolari, essendo rilevabile nel 90% di tali pazienti. Questo tipo di legame, specie dell'*H. pylori* e del campylobacter jejuni, starebbe alla base nella genesi di una malattia a carattere fortemente demielinizzante: la S. di Guillan-Barrè.



Analisi strutturale dei domini della VacA matura. Questa è composta da un distinto dominio amino-terminale (p37) (barra bianca) e un dominio carbossile-terminale (p58) (barra nera). Il frammento minimo della VacA che induce la vacuolizzazione cellulare quando direttamente espresso all'interno delle cellule dei mammiferi comprende i residui da 1 a 422. Il presunto dominio della VacA che funge da legame recettoriale è stato localizzato nella regione centrale della p58 (regione tratteggiata). È stata evidenziata anche la sequenza aminoacidica della VacA amino-terminale (residui 1-17) per l'importanza che riveste nella vacuolizzazione cellulare VacA-mediata (barra grigia). L'eliminazione degli ultimi 8 domini dalla 37kD (33kD) amino-terminale sembra ridurre fortemente l'azione vacuolizzante della citotossina VacA.

Da anni ormai l'interesse del mondo scientifico è rivolto in particolar modo non soltanto al fatto che la presenza del batterio possa determinare delle conseguenze patologiche a livello distrettuale, gastrico, **ma soprattutto al fatto che la persistenza in circolo di anticorpi della classe IgG, diretti verso frazioni particolari del batterio, fortemente immunogene, possano dar luogo allo**

*sviluppo di patologie ad impronta autoimmune: per esempio le tiroiditi. La metodica che viene spesso utilizzata, in tutti questi lavori, per determinare la presenza delle IgG suddette, è il **Western Blot**. Tale sistema di diagnosi è quello, oggi, che dà la maggiore sensibilità e specificità di risposta nei confronti non solo del batterio in questione ma anche nei riguardi di altri tipi di innesco infettivo: per esempio **EBV, Borrelia Burgdorferi, etc.** Oltre a questo si aggiunga il fatto, non trascurabile, per altro, che il test fornisce utili informazioni per quanto riguarda la quota quantitativa e qualitativa delle IgG suddette legate, la prima, alla lunghezza della banda in questione, la seconda, all'intensità del colore che spesso va dal bianco intenso al grigio scuro (tanto più ci si avvicina a quest'ultima tonalità di colore tanto più la banda in questione è specifica per il batterio) (Fig.1)*

*Le bande caratteristiche, sul grafico, sono rappresentate da lunghi rettangoli che in base alla loro lunghezza indicano la percentuale di anticorpi presenti riferiti, questi ultimi, a quel determinato antigene specifico del batterio. **Questo, in ultima istanza, quantifica la presenza degli anticorpi.** Al contrario invece, tanto più le bande specifiche del batterio si avvicinano al grigio intenso, tanto più sono specifiche, tanto più si avvicinano al bianco tanto meno sono specifiche e quindi potrebbero essere legate ad altri inneschi infettivi con i quali il batterio condivide antigeni in comune, per una sorta di mimetismo molecolare (vedi la 41kD con la Borrelia, la 57kD con le Chlamydie, nonostante sul W. Blot di H. pylori le 57kD stanno a rappresentare le Hsp58 del batterio stesso, etc.).*

*Vero è che, con questo test è possibile rilevare anche la forma non aggressiva del batterio, e cioè quella che da luogo alla reazione enzimatica dell'ureasi, la quale, d'altronde, è quella che comunemente risulta positiva nei test diagnostici in uso, comunemente utilizzati per fare diagnosi di infezione da H. pylori: **Urea-Breath-test e CP-test della gastroscopia.** Entrambi sfruttano lo stesso sistema di indagine, la reazione enzimatica dell'ureasi, **oggi decisamente molto riduttivo e assolutamente inutile** nella diagnosi delle forme di H. pylori **ureasi negative** che sono le più aggressive: **VacA e CagA.** Sono queste le vere responsabili dei problemi gravi a livello gastrico, tumore compreso, ma soprattutto della genesi dei disturbi immunomediati in varie sedi dell'organismo (Parkinson, Alzheimer, trombocitopenie, tiroiditi, linfomi, etc.).*

ID Pazienti:
 nome:
 Data di accettazione: 07/10/2010
 Risultati da: 08/10/2010

Test: Helicobacter pylori IgG
 Lab numero:
 Numero:
 Ricevimento del campione:

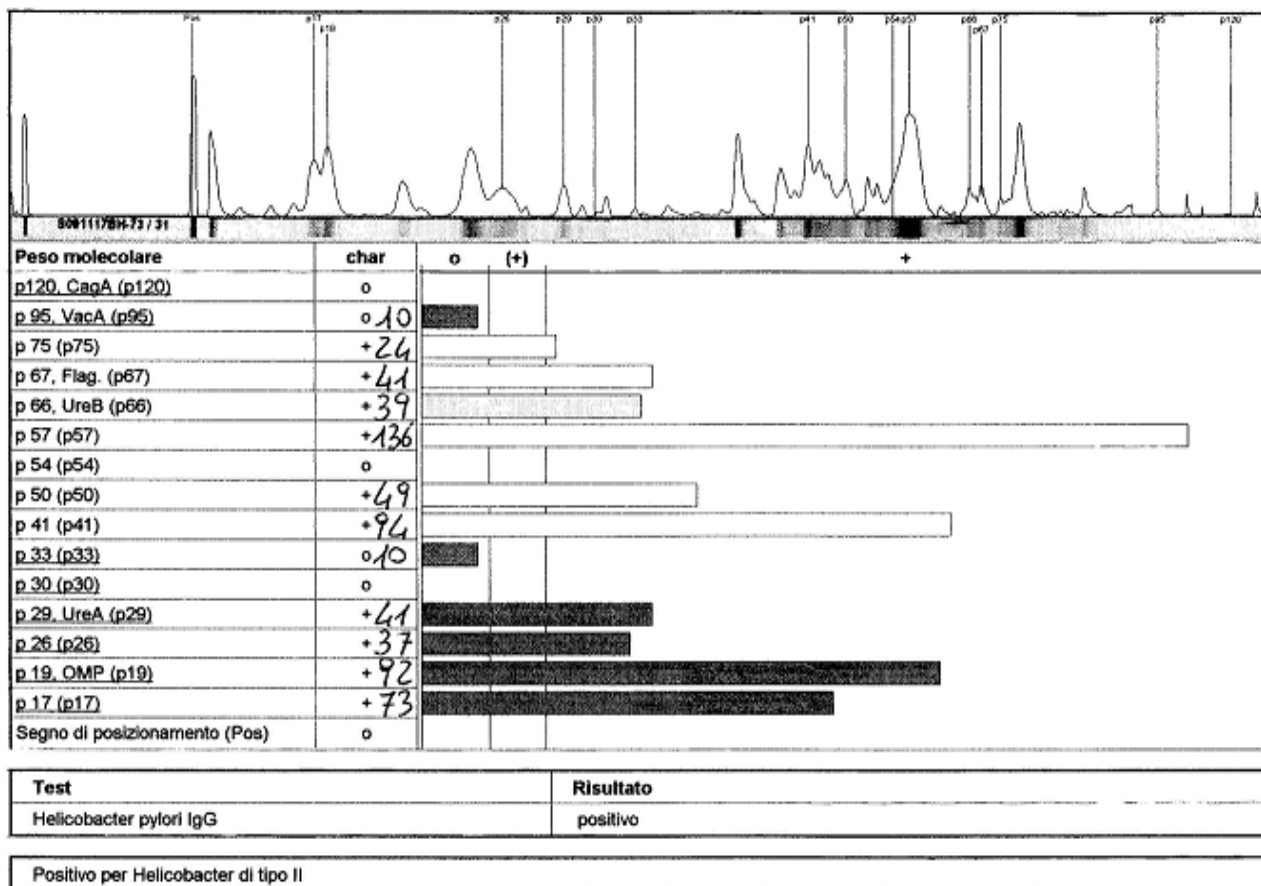


Fig. 1

Qual'ora la risposta del test indichi la presenza delle bande non significative (29kD, 30kD, 31kD, 50kD, 54kD, 75kD, etc.) allora si parlerà di *H. pylori* di tipo II (per intenderci la versione ureasi positiva); quando invece si positivizzano le bande specifiche del batterio (120kd ovvero CagA, 95kd ovvero VacA, 19kD, 57kD, 37kD, etc.) allora si parlerà di *H. pylori* di tipo I (quello che, sia Breath-test che CP-test della gastroscopia, non evidenziano MAI).

Recentemente, in merito al disturbo autoimmune tiroideo, sono stati messi a confronto 4 gruppi di studio: il primo con presenza di AT (tiroidite autoimmune) come evento unico, il secondo in cui lo stesso problema veniva a far parte della sindrome polighiandolare come entità autoimmune, un terzo con le stesse caratteristiche del secondo, ma inquadrato però in una sindrome

polighiandolare di tipo II e infine un quarto gruppo usato come controllo. I dati emersi, attraverso la titolazione delle IgG e IgA specifiche dirette contro il batterio, hanno messo in evidenza una netta prevalenza di queste immunoglobuline specie nei primi 2 gruppi ma, la cosa più interessante è stata che, attraverso il W. Blot di cui sopra, si è visto che tali IgG specifiche erano dirette unicamente, in percentuale maggiore, verso 3 componenti in particolare: 95kD (VacA), 30kD, 17kD (questo dato è risultato maggiore, in percentuale, specie nei primi due gruppi di studio, assolutamente ininfluyente o addirittura assente nel terzo e quarto gruppo). (52)

*Per concludere possiamo dire che ad oggi sono state scoperte almeno 2 frazioni importanti dell'*H. pylori* con funzione Hsp, le quali sono localizzate, attraverso l'indagine Western Blot, su due bande ben precise del test: la prima a livello della 13kD viene denominata HspA e la seconda, la 58kD, denominata HspB (l'unica di cui si conoscono gli effetti). Ne esisterebbe una terza, sul W. Blot, la 54kD, che è assimilabile alle Hsp60 umane.*

*Questo lavoro è servito a comprendere un concetto fondamentale nello sviluppo della patologia autoimmune legata all'*H. pylori*: le varie frazioni cellulari coinvolte nella patogenesi della VacA hanno un ruolo fondamentale perché permettono di modulare la posizione della VacA stessa a livello delle membrane cellulari dell'ospite determinando, a seconda dei casi, o la sua permanenza a livello esterno, oppure la sua internalizzazione. Fra i diversi fattori di virulenza identificati sino ad ora, la citotossina associata al gene A (CagA), l'isola di patogenicità (CagPAI) e la tossina vacuolizzante A (VacA), sono stati in modo particolare correlati alla patogenicità del batterio. La CagA è una proteina di 120-145 kDa, normalmente presente nel 60-70% dei ceppi di *H. Pylori*. La CagPAI è un cluster di 29 geni di circa 37 kb. Alcuni dei geni presenti in questa isola codificano per l'apparato di secrezione batterica di tipo IV, attraverso il quale è possibile che avvenga la traslocazione della CagA all'interno delle cellule ospiti. La successiva fosforilazione della CagA può attivare diverse "pathways" all'interno della cellula ospite in grado quindi di influenzare importanti funzioni cellulari quali la proliferazione, l'apoptosi, o il rilascio di citochine. Circa la metà dei batteri *H. Pylori* produce inoltre la tossina VacA. A differenza della tossina CagA, la VacA è presente in quasi tutti i ceppi. La sequenza genica che codifica questa tossina è vicina a quella della CagA (anche se collocata all'esterno della CagPAI). Il gene per la VacA presenta un polimorfismo allelico che interessa sia la sequenza di segnale (s1a, s1b, s1c, s2) che quella intermedia (m1, m2). I ceppi che presentano l'allele che codifica per la sequenza iniziale s1 producono una tossina funzionale, mentre quelli con genotipo s2 presentano una ridotta attività della tossina. Inoltre*

i ceppi con genotipo s1/m2 possono essere associati a forme severe di gastrite atrofica e metaplasia intestinale. (53)

A questo si aggiunga tutta una serie di fenomeni legati alla formazione dei cosiddetti canali anione che permettono al batterio di trarre nutrimento in un ambiente decisamente ostile e che oltremodo gli permettono di eludere la risposta immune dell'ospite attraverso il blocco dell'espressione di particolari determinanti come il CD69, il quale, a sua volta, è sotto il diretto controllo del CD3 (TCR-CD3). Tutto questo comporta inoltre una ridotta processazione di antigene da parte del sistema deputato a livello del mezzo interno (APC) e quindi una ridotta risposta immune nei confronti del batterio e una sua cronica persistenza a livello dell'ambiente gastrico.

Bibliografia:

- (1) *Gastroenterologia, autoimmunità: Il ruolo di H. pylori nei fenomeni autoimmuni: Dott. Alberto Torelli*
- (2) Suerbaum, S., and M. Achtman. 2001. *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, 330 pp.
- (3) Leunk, R.D., P.T. Johnson, B.C. David, W.G. Kraft, and D.R. Morgan. 1988. Cytotoxin activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26:93–99. [[PubMed](#)]
- (4) Cover, T.L., and M.J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 267:10570–10575. [[PubMed](#)]
- (5) Reytrat, J.M., R. Rappuoli, and J.L. Telford. 2000. A structural overview of the *Helicobacter* cytotoxin. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:375–379. [[PubMed](#)]
- (6) de Bernard, M., E. Papini, V. de Filippis, E. Gottardi, J. Telford, R. Manetti, A. Fontana, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1995. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J. Biol. Chem.* 270:23937–23940. [[PubMed](#)]
- (7) Cover, T.L., P.I. Hanson, and J.E. Heuser. 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin, reveals its pattern of assembly. *J. Cell Biol.* 138:759–769. [[PubMed](#)]
- (8) Yahiro, K., T. Niidome, M. Kimura, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, K. Imagawa, A. Wada, J. Moss, and T. Hirayama. 1999. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J. Biol. Chem.* 274:36693–36699. [[PubMed](#)]

- (9) Yahiro, K., A. Wada, M. Nakayama, T. Kimura, K. Ogushi, T. Nidome, H. Aoyagi, K. Yoshino, K. Yonezawa, J. Moss, and T. Hirayama. 2003. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.* 278:19183–19189. [[PubMed](#)]
- (10) Ricci, V., A. Galmiche, A. Doye, V. Necchi, E. Solcia, and P. Boquet. 2000. High 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. [[PubMed](#)]
- (11) Seto, K., Y. Hayashi-Kuwabara, T. Moneta, H. Suda, and H. Tamaki. 1998. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett.* 431:347–350. [[PubMed](#)]
- (12) Moll, G., E. Papini, R. Colonna, D. Burrioni, J.L. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1995. Lipid interaction of the 37-kDa and 58-kDa fragments of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Eur. J. Biochem.* 234:947–952. [[PubMed](#)]
- (13) Molinari, M., C. Galli, M. de Bernard, N. Norais, J.M. Ruyschaert, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1998. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:334–340. [[PubMed](#)]
- (14) Tombola, F., C. Carlesso, I. Szabò, M. de Bernard, J.M. Reyrat, J.L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti. 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys. J.* 76:1401–1409. [[PubMed](#)]
- (15) Iwamoto, H., D.M. Czajkowsky, T.L. Cover, G. Szabo, and Z. Shao. 1999. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.* 450:101–104. [[PubMed](#)]
- (16) Pagliaccia, C., X.M. Wang, F. Tardy, J.L. Telford, J.M. Ruyschaert, and V. Cabiaux. 2000. Structure and interaction of Vac of *Helicobacter pylori* with a lipid membrane. *Eur. J. Biochem.* 267:104–109. [[PubMed](#)]
- (17) Czajkowsky, D.M., H. Iwamoto, T.L. Cover, and Z. Shao. 1999. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:2001–2006. [[PubMed](#)]
- (18) Szabò, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J.L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti. 1999. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 18:5517–5527. [[PubMed](#)]
- (19) Debellis, L., E. Papini, C. Montecucco, and S. Curci. 2001. *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 281:G1440–G1448.

- (20) Montecucco, C., and R. Rappuoli. 2001. *Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach.* *Nat. Rev. Cell Biol.* 2:457–466.
- (21) Papini, E., B. Satin, N. Norais, M. de Bernard, J.L. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1998. *Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin.* *J. Clin. Invest.* 102:813–820. [[PubMed](#)]
- (22) McLain, M.S., W. Schraw, V. Ricci, P. Boquet, and T.L. Cover. 2000. *Acid activation of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells.* *Mol. Microbiol.* 37:433–442. [[PubMed](#)]
- (23) Ricci, V., P. Sommi, R. Fiocca, M. Romano, E. Solcia, and U. Ventura. 1997. *Helicobacter pylori vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia.* *J. Pathol.* 183:453–459. [[PubMed](#)]
- (24) Papini, E., B. Satin, C. Bucci, M. de Bernard, J.L. Telford, R. Manetti, R. Rappuoli, M. Zerial, and C. Montecucco. 1997. *The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin.* *EMBO J.* 16:15–24. [[PubMed](#)]
- (25) Papini, E., E. Gottardi, B. Satin, M. de Bernard, J. Telford, P. Massari, R. Rappuoli, S.B. Sato, and C. Montecucco. 1996. *The vacuolar ATPase proton pump is present on intracellular vacuoles induced by Helicobacter pylori.* *J. Med. Microbiol.* 44:1–6. [[PubMed](#)]
- (26) Satin, B., N. Norais, J.L. Telford, R. Rappuoli, M. Murgia, C. Montecucco, and E. Papini. 1997. *Vacuolating toxin of Helicobacter pylori inhibits maturation of procathepsin D and degradation of epidermal growth factor in HeLa cells through a partial neutralization of acidic intracellular compartments.* *J. Biol. Chem.* 272:25022–25028. [[PubMed](#)]
- (27) Watts, C. 2000. *Antigen processing in the endocytic compartment.* *Curr. Opin. Immunol.* 13:26–31.
- (28) Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco. 1998. *Selective inhibition of Li-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA.* *J. Exp. Med.* 187:135–140. [[PubMed](#)]
- (29) Shirai, M., T. Arichi, T. Nakazawa, and J.A. Berzofsky. 1998. *Persistent infection by Helicobacter pylori down-modulates virus-specific CD8+ cytotoxic T cell response and prolongs viral infection.* *J. Infect. Dis.* 177:72–80. [[PubMed](#)]
- (30) Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. 2003. *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T-lymphocyte activation.* *Science.* 301:1099–1102. [[PubMed](#)]
- (31) Boncristiano, M., S. Rossi Paccani, S. Barone, C. Ulivieri, L. Patrussi, D. Ilver, A. Amedei, M.M. D'Elia, J.L. Telford, and C.T. Baldari. 2003. *The Helicobacter pylori*

- vacuolating toxin inhibits T-cell activation by two independent mechanisms. J. Exp. Med.* 198:1887–1897. [[PubMed](#)]
- (32) de Bernard, M., D. Burroni, E. Papini, R. Rappuoli, J.L. Telford, and C. Montecucco. 1998. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect. Immun.* 66:6014–6016. [[PubMed](#)]
- (33) Ye, D., D.C. Willhite, and S.R. Blanke. 1999. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Biol. Chem.* 274:9277–9282. [[PubMed](#)]
- (34) Rao, A., C. Luo, and P.G. Logan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:707–747. [[PubMed](#)]
- (35) Hogan, P.G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205–2232. [[PubMed](#)]
- (36) Coso, O.A., M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Mikš, and J.S. Gutkind. 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signalling pathway. *Cell.* 81:1137–1146. [[PubMed](#)]
- (37) Bagrodia, S., B. Derijard, R.J. Davis, and R.A. Cerione. 1995. Cdc42 and PAK-mediated signalling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270:27995–27998. [[PubMed](#)]
- (38) Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch. 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* 270:23934–23936. [[PubMed](#)]
- (39) Huang, J., D. Tilly, A. Altman, K. Sugie, and H.M. Grey. 2000. T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:10923–10929. [[PubMed](#)]
- (40) Huang, J., K. Sugie, D.M. La Face, A. Altman, and H.M. Grey. 2000. TCR antagonist peptides induce formation of APC-T cell conjugates and activate a Rac signalling pathway. *Eur. J. Immunol.* 30:50–58. [[PubMed](#)]
- (41) Fujikawa, A., D. Shirasaka, S. Yamamoto, H. Ota, K. Yahiro, M. Fukada, T. Shintani, A. Wada, N. Aoyama, T. Hirayama, et al. 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat. Genet.* 33:375–381. [[PubMed](#)]
- (42) Supajatura, V., H. Ushio, A. Wada, K. Yahiro, K. Okumura, H. Ogawa, T. Hirayama, and C. Ra. 2002. VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* directly activates mast cells for migration and production of pro-inflammatory cytokines. *J. Immunol.* 168:2603–2607. [[PubMed](#)]
- (43) de Bernard, M., D. Burroni, E. Papini, R. Rappuoli, J. Telford, and C. Montecucco. 1998. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect. Immun.* 66:6014–6016. [[PubMed](#)]

- (44) Reytrat, J.M., S. Lanzavecchia, P. Lupetti, M. de Bernard, C. Pagliaccia, V. Pelicic, M. Charrel, C. Ulivieri, N. Norais, X. Ji, et al. 1999. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J. Mol. Biol.* 290:459–470. [[PubMed](#)]
- (45) Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447–461. [[PubMed](#)]
- (46) Valensin, S., S.R. Paccani, C. Ulivieri, D. Mercati, S. Pacini, L. Patrussi, T. Hirst, P. Lupetti, and C.T. Baldari. 2002. F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur. J. Immunol.* 32:435–446. [[PubMed](#)]
- (47) 24. D'Elíos, M.M., M. Manghetti, M. De Carli, F. Costa, C.T. Baldari, D. Burrioni, J.L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete. 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* 158:962–967. [[PubMed](#)]
- (48) 7. Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco. 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* 187:135–140. [[PubMed](#)]
- (49) Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R, Telford JL: Oligomeric and subunit structure of the helicobacter pylori vacuolating cytotoxin; *J cell. Biol.* 1996 May; 133(4): 801-7
- (50) Akihiro Wada^{1,2}, Makoto Hasegawa⁶, Pooi-Fong Wong⁷, Emi Shirai⁶, Nobuaki Shirai⁸, Li-Jing Tan⁹, Rafael Llanes¹⁰, Hironobu Hojo¹¹, Eiki Yamasaki¹², Akitoyo Ichinose³, Yoshio Ichinose⁴ and Masachika Senba⁵: Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity. *Glycobiology* 2010 20(6):668-678; doi:10.1093/glycob/cwq014
- (51) [Gu Q](#), [Song D](#), [Zhu M](#). Oral vaccination of mice against *H. pylori* with recombinant *Lactococcus lactis* expressing urease subunit B. [FEMS Immunol Med Microbiol.](#) 2009 Aug;56(3):197-20 ub 2009 May 153. *Ep*
- (52) [Sterzl I](#), [Hrda P](#), [Potuznikova B](#), [Matucha P](#), [Hana V](#), [Zamrazil V](#). Autoimmune thyroiditis and *Helicobacter pylori*--is there a connection? [Neuro Endocrinol Lett.](#) 2006 Dec;27 Suppl 1:41-5.
- (53) Malfertheiner P, Megraud F, O'Morian C et al. Current concepts in management of *Helicobacter Pylori* infection- The Maastricht III Consensus Report. ***GUT*** 2007;56:772-81

