



نقش‌های توالی EPIYA در برهم زدن مسیرهای پیام‌رسانی سلولی و خطر بروز سرطان

فاطمه صفری: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران (* نویسنده مسئول) fsafari@guilan.ac.ir
ملیحه شکوه‌فرد: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

توالی‌های EPIYA،
توکسین‌های باکتریایی،
پروتئین‌های میزبان،
پیام‌رسانی سلولی،
سرطان

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۳

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۶/۱۹

پروتئین‌های اثرگر برخی از باکتریهای مهاجم دارای توالی EPIYA و یا توالی مشابه آن هستند که شامل اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید، پرولین، ایزولوسین، تیروزین و الاین می‌باشد و اغلب از طریق سیستم ترشحی نوع سه و یا نوع چهار به سلول میزبان منتقل می‌شوند و در اسید آمینه تیروزین موجود در توالی‌های مذکور فسفریله می‌گردند. فسفریله شدن تیروزین موجود در پروتئین‌های اثرگر باکتریها، آنها را قادر می‌سازد که با پروتئین‌های حاوی دمین SH2 سلول میزبان برهم‌کنش نمایند. اخیراً، نشان داده است که تعدادی از پروتئین‌های سلول میزبان نیز حاوی توالی‌های مذکور هستند و با فسفریله شدن تیروزین قادر به برهم‌کنش با پروتئین‌های حاوی دمین SH2 داخل سلولی بطور اختصاصی می‌باشند. بنابراین فرض شده است که توالی‌های موجود در سلول‌های میزبان ممکن است توسط باکتریهای مهاجم ربوده شده و با برهم‌کنش با تعداد زیادی پروتئین‌های حاوی SH2 دومین سلول میزبانی مانند "شاه کلید" عمل کند که باعث برهم‌زدن مسیرهای پیام‌رسانی سلول می‌گردد. در همین ارتباط نشان داده شده است که در برخی از باکتریها EPIYA موتیف ساختار بدون تا خوردگی و دارای خاصیت انعطاف‌پذیری دارد. تا کنون ساختار پروتئین‌های میزبانی حاوی توالی‌های EPIYA شناخته نشده است. در این مقاله مروری، نقش‌های عملکردی توالی‌های EPIYA در توکسین‌های باکتریایی و پروتئین‌های میزبانی را به عنوان توالی‌های کلیدی در جهت برهم‌زدن مسیرهای پیام‌رسانی سلولی و خطر بروز سرطان مورد بررسی قرار می‌دهیم.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه‌استناد به این مقاله:

Safari F, Shokouhfard M. The roles of EPIYA sequence to perturb the cellular signaling pathways and risk of cancer. Razi J Med Sci. 2020;27(6):90-102.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

The roles of EPIYA sequence to perturb the cellular signaling pathways and risk of cancer

- © **Fatemeh Safari**, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran (*Corresponding author) fsafari@guilan.ac.ir
Maliheh Shokouhfard, Biotechnology Research Center, International Campus, Shahid Sadoghi University of Medical Science, Yazd, Iran

Abstract

It was shown that several pathogenic bacterial effector proteins including *Helicobacter pylori* CagA, *Anaplasma phagocytophilum* Anka, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir protein, *Chlamydia trachomatis* Tarp, *Haemophilus ducreyi* LspA protein, and *Bartonella henselae* Bep proteins contain the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) or a similar sequence. These bacterial EPIYA effectors are delivered into host cell via type III secretion system (or TTSS) or type IV secretion system (TFSS), where they undergo tyrosine phosphorylation at the EPIYA (or a similar sequences). The bacterial EPIYA effectors trigger interaction with huge number of host cell SH2 domain-containing proteins and thereby, they enable to manipulate host cell signaling for more effective infection. The EPIYA (or a similar sequence) of pathogenic bacterial effector proteins was discovered in *H. pylori* CagA. It was shown that *cagA*⁺ *H. pylori* strains significantly increase the risk of developing severe gastritis and gastric carcinoma. On the base of the geographic region, four distinct EPIYA-sites have been described, EPIYA-A, -B, -C, and -D, each of which is conserved. Remarkably, the EPIYA-A and EPIYA-B sequences are found in strains throughout the world, but EPIYA-C is mainly present in strains from Western countries (Australia, Europe and North America) and some Asian countries (India and Malaysia), while the EPIYA-D sequence predominates in China, Japan and Korea. Different numbers of EPIYA (or similar sequence) can appear at the C-terminal of CagA variants. CagA proteins were tyrosine phosphorylated by Src family kinases (SFKs) and then by c-Abl kinase. It was shown that EPIYA-A, -B, and -C (or -D) segments can interact with SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1), SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), growth factor receptor bound protein 2 (Grb2), growth factor receptor bound protein 7 (Grb7), growth factor receptor bound protein 10 (Grb10), the C-terminal Src kinase (Csk), Ras GTPase activating protein 1 (RasGap1), Crk like proto-oncogene, adaptor protein (CrkL). Moreover, it was found that *H. pylori* induced a characteristic morphology of host epithelial cells, which has been referred to as the hummingbird phenotype. It was revealed that the hummingbird phenotype was resulting from regulation of both the actin cytoskeleton and focal adhesion and it may be involved in carcinogenesis. Notably, it was well established that CagA injection induces the elongation morphology of host cell. Furthermore, the roles of the EPIYA (or a similar sequence) in perturbation of eukaryotic signal transduction pathways for the other pathogenic bacterial effector proteins were investigated. *A. phagocytophilum* Anka contains four different types of EPIYA segments termed EPIYA-A, -B, -C and -D. These EPIYA sequences were phosphorylated by either SFKs or c-Abl kinase and it can interact with SHP1. SHP1 phosphatase activity in infected neutrophils was deregulated after SHP1/Anka complex formation. EPEC Tir was tyrosine phosphorylated at EPIYA similar sequences and it was able to interact with the SH2

Keywords

EPIYA sequences,
Bacterial effector
proteins,
Host proteins,
Cell signaling,
Cancer

Received: 02/05/2020

Published: 09/09/2020

domain-containing adaptor protein Nck and Nck/Tir complex formation promotes actin polymerization. *C. terachomatis* Tarp was tyrosine phosphorylated at the EPIYA similar sequences resulting the rearrangements of the cytoskeletal of host cells. The EPIYA similar sequences of *H. ducreyi* LspA were tyrosine phosphorylated by SFKs and it was found that tyrosine-phosphorylated LspA inhibited SFKs activity. SFKs are responsible for tyrosine phosphorylation of *B. henselae* Bep at EPIYA similar sequences. After tyrosine phosphorylation *B. henselae* Bep at EPIYA similar sequence, they acquire the ability to interact with Csk and SHP2.

From the other side, it was also shown that a large number of mammalian proteins contain EPIYA (or a similar sequence). Until now, functional EPIYA (or a similar sequence) was found only in two mammalian proteins (Pragmin and P140Cap). Pragmin (or SGK223), a cytoplasmic pseudokinase, contains a functional EPIYA sequences in its N-terminal region. It was found that Pragmin is tyrosine-phosphorylated at EPIYA sequence by SFKs, Csk or in response to external stimuli such as epidermal growth factor (EGF). Moreover, P140Cap (or SRC kinase signaling inhibitor 1) contains two functional EPIYA sequences (EPLYA, EGLYA) in its N-terminus and it was tyrosine-phosphorylated at EPLYA and EGLYA sequences by c-Abl kinase. Tyrosine phosphorylation at EPIYA sequences enable them to interact with Csk (a SH2-domain containing protein) specifically. Also, it was found that the overexpression of Pragmin in AGS cells induced the elongated cell morphology. In this regard, it was previously shown that SGK223/Pragmin expression were increased in pancreatic cancer cells and overexpression of SGK223/Pragmin promotes elongation of cell morphology and migration of cells in pancreatic cancer cells.

It was proposed that the mammalian EPIYA motifs might have been exploited by pathogenic bacteria and they act as pathogenic “Master keys” to perturb multiple signaling pathways through promiscuous binding with SH2 domain-containing proteins. Also, it was found that EPIYA sequences in some bacterial effector proteins (such as EPEC Tir and *H. pylori* CagA) to be unfolded and they showed structural flexibility features. So, it would be interesting to determine whether the other bacterial EPIYA effectors (such as *A. phagocytophilum* AnkA, *C. terachomatis* Tarp, *H. ducreyi* LspA, and *B. henselae* Bep) have disordered features at EPIYA (or similar sequences). In mammals, the structure of proteins containing functional EPIYA (or similar sequences) has not investigated yet. It seems that mammalian proteins containing functional EPIYA sequences do not have disordered features at EPIYA (or similar sequences) and thereby, they unable to interact with multiple SH2-domain containing proteins. Notably, the most of mammalian proteins containing functional EPIYA (or similar sequences) are unknown and there is no information about them. By using PhosphoSite, it was explored the EPIYA (or similar sequences) in mammalian proteins and it was predicted that the most of mammalian proteins containing EPIYA (or similar sequences) showed no tyrosine phosphorylation at the EPIYA (or similar sequences). It seems that the EPIYA (or similar sequences) of mammalian proteins are not available for related kinases because of possible their restricted and inflexible structures. Up to now, the structure of mammalian host proteins containing EPIYA motifs is not revealed.

In this review, we investigate the roles of functional EPIYA sequences as key sequences in several pathogenic bacterial effector proteins and mammalian proteins to perturb cell signal transduction pathways that it was associated with a large number of diseases including cancer.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Safari F, Shokouhfard M. The roles of EPIYA sequence to perturb the cellular signaling pathways and risk of cancer. Razi J Med Sci. 2020;27(6):90-102.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

خود دریافت نموده و در جهت بهینه کردن شرایط در میزبان‌های خویش مورد استفاده قرار می‌دهند (۴، ۵). همچنین نشان داده شده که توالی‌های موجود در پروتئین‌های میزبانی نیز در صورت عدم کنترل و تنظیم می‌توانند مسیرهای پیام‌رسانی را در سلول دچار اختلال نمایند و به شکل بیماری و بویژه سرطان ظهور نماید (۶، ۷). در حقیقت این مطالعات نشان از اهمیت توالی‌های مذکور در حفظ عملکرد سلول و تعادل فیزیولوژیکی بدن دارد. تحقیقات درباره عملکرد این توالی‌ها در پروتئین‌های میزبانی می‌تواند راهگشای مناسب برای شناسایی مکانیسم‌هایی باشد که باکتریها در سلول میزبان استفاده می‌کنند. شناسایی این مکانیسم‌های باکتریایی در سلول میزبان ما را در طراحی روش‌های موثر در جلوگیری از گسترش عفونت این باکتریها در سلول میزبان و بخصوص راه‌کارهای درمانی کمک نماید. در این مقاله به توالی‌های EPIYA موجود در توکسین‌های باکتریایی و پروتئین‌های میزبانی اشاره شده و همچنین نقش مهم آنها در برهم زدن مسیرهای مختلف پیام‌رسانی سلولی و خطر بروز سرطان مورد بررسی واقع خواهد شد.

توکسین CagA هلیکوباکتر پیلوری و نقش EPIYA موتیف در بروز سرطان معده

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است که بعنوان کارسینوژن کلاس یک شناخته شده است و شایع‌ترین عامل سرطان مرتبط با عفونت محسوب می‌شود (۸). توکسین CagA با وزن مولکولی ۱۴۵-۱۲۰ کیلو دالتون توسط جزیره بیماری‌زایی cag (cagPAI) ساخته می‌شود (۹، ۱۰). تحقیقات نشان داده است که سویه باکتریایی CagA مثبت در ایجاد سرطان معده نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند.

موتیف‌های EPIYA موجود در پروتئین CagA در انتهای C ترمینال واقع شده‌اند و براساس توالی‌های اطراف موتیف EPIYA چهار نوع توالی متفاوت در CagA شناسایی شده است و در مجموع دو نوع تیپ کلی CagA در دنیا مشخص شده است. سویه‌های جدا شده هلیکوباکتر پیلوری از کشورهای آسیایی شرقی (مانند چین، کره و ژاپن) دارای CagA با آرایش

باکتری‌ها برای بقا و زیستن در میزبان خود سعی می‌کنند که شرایط بهینه رشدشان را با تغییر و دستکاری مسیرهای پیام‌رسانی میزبانی فراهم نمایند. به همین منظور توکسین‌های خود را به سلول میزبانی وارد می‌نمایند. سیستم‌های ترشحی متفاوتی برای انتقال توکسین‌های باکتریایی تا کنون شناخته شده است. مطالعات نشان داده است که تعدادی از باکتری‌هایی که اغلب با کمک سیستم‌های ترشحی نوع سوم و یا نوع چهارم (type III/IV secretion system) توکسین‌های خود را به سلول میزبان وارد می‌نمایند، توکسین‌های مربوطه شان در اسیدامینه تیروزین موجود در توالی‌های EPIYA (شامل اسیدامینه‌های گلوتامیک اسید، پرولین، ایزولوسین، تیروزین و آلانین) فسفریله می‌گردند. فسفریله شدن تیروزین در توالی‌های مذکور توکسین‌های باکتریایی، باعث برهم‌کنش آنها با پروتئین‌های میزبانی حاوی دمین SH2 می‌شود. برهم‌کنش‌هایی که باعث اختلال در مسیرهای پیام‌رسانی سلول میزبانی شده و شرایط بهینه را برای استقرار باکتری و ایجاد عفونت و گسترش بیماری فراهم می‌نماید (۱-۳). تا کنون در توکسین‌های شش نوع باکتری مختلف، توالی‌های EPIYA (یا شبه EPIYA) شناسایی شده است که شامل CagA هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*)، Anka آناپلازما فاگوسیتوفیلوم (*A. phagocytophilum*)، Tarp کلامیدیا تراکوماتیس (*C. trachomatis*)، LspA هموفیلوس دوکری (*H. ducreyi*)، Bep بارتونلا هنسلا (*B. henselae*) و Tir اشرشیا کلی انتروپاتوژنیک (EPEC) می‌باشد (جدول ۱). نکته قابل‌تامل اینست که در میان این باکتریها، نقش هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد سرطان معده ثابت شده است و درمورد ارتباط باکتری‌های دیگر حاوی توالی‌های EPIYA (یا EPIYA موتیف) با سرطان، هنوز اطلاعاتی موجود نیست. همچنین، توالی‌های EPIYA موتیف برای اولین بار میان باکتریها در هلیکوباکتر پیلوری شناخته شد و مورد بررسی واقع شد.

از طرف دیگر، در چندین مطالعه نشان داده است که توالی‌های مورد نظر در پروتئین‌های میزبانی نیز موجود هستند. به نظر می‌رسد باکتریها این توالیها را از میزبان

جدول ۱- باکتری‌های حاوی موتیف‌های EPIYA و تیروزین‌کینازهای فسفوریله‌کننده میزبانی آنها

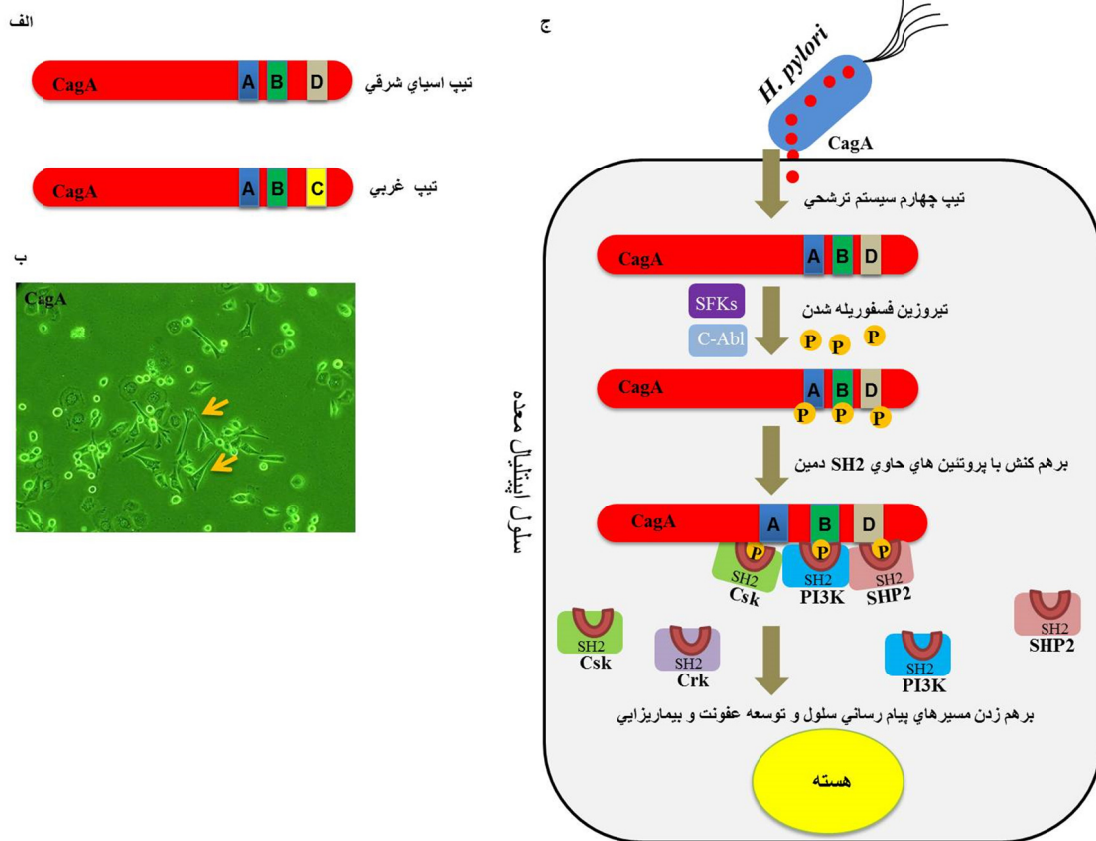
| پاتوزن | توکسین مربوطه | موتیف EPIYA (یا شبه EPIYA) | کیناز میزبانی مسئول فسفوریله کردن تیروزین | پروتئین‌های میزبانی حاوی SH2 دومین برهم‌کنش‌کننده با EPIYA موتیف‌ها در باکتریها |
|--|---------------|----------------------------|---|---|
| هلیکوباکتر پیلوری (۱۹، ۲۲-۱۸، ۱۴، ۱۳) | CagA | EPIYA | SFKs, c-Abl | CSK, SHP1, SHP2, Grb2, Grb7, RasGap1 |
| اناپلازما فاگوسیتوفیلوم (۲۴) | AnkA | EPIYA | SFKs, c-Abl | SHP1 |
| کلامیدیا تراکوماتیس (۲۹-۲۵) | Tarp | ENIYE | SFKs, Abl, Syk | PI3K, Grb2, Grb7, Grb10, Cb1 |
| هموفیلوس دوکری (۳۳-۳۰) | LspA | EPIYG, EPVYA | SFKs | Unknown |
| بارتونلا هنسلا (۳۴، ۱۹) | Bep | EPLYA | SFKs | CSK, SHP1, SHP2, CrkL, Crk, RasGap1, Grb2, Grb7 |
| انتروپاتوژنیک اشرشیا کلی (۴۰-۳۵) | Tir | VNPYA, EHIYD | c-Fyn, Abl/Arg | PI3K, Cb1, NCK, SHP2, RasGap1, Src |

را دارا است. نتیجه تحقیقات متعدد نشان داده است که قطعه EPIYA-A و یا EPIYA-B با پروتئین C-CSK (terminal of Src Kinase) قطعاً EPIYA-B با زیرواحد تنظیم‌کننده PI3K p85 (Phosphatidylinositol-3 kinase) و قطعه EPIYA-C (-D) با SHP2 برهم‌کنش می‌دهند (۱۸-۲۱) (شکل ۱، ج). همچنین، تیروزین فسفوریله شده در موتیف EPIYA پروتئین CagA قادر به برهم‌کنش با پروتئین Crk (نوعی آداپتور پروتئین است که حاوی دومین SH2 است) نیز می‌باشد ولی قطعه مسئول این برهم‌کنش مشخص نمی‌باشد (۲۲).

نقش توالی EPIYA موجود در توکسین *AnkA* آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در برهم‌زدن پیام‌رسانی سلول میزبان

آنپلازما فاگوسیتوفیلوم یک باکتری گرم منفی است که داخل گرانولوسیت‌ها زندگی می‌کند. *AnkA*، یک پروتئین با وزن مولکولی ۱۹۰-۱۶۰ کیلودالتونی می‌باشد. این پروتئین از طریق تیپ سوم سیستم ترشحی به سلول میزبانی منتقل می‌شود (۲۳، ۲۴). چهار نوع متفاوت از موتیف EPIYA به نامهای EPIYA-A، EPIYA-B، EPIYA-C، EPIYA-D انتهای C ترمینال *AnkA* وجود دارد که توسط کینازهای میزبانی مانند SFKs و c-Abl فسفوریله می‌شود و قادر به برهم‌کنش با SHP1 می‌باشد که یک

EPIYA-A، EPIYA-B، EPIYA-D یا تیپ ABD (تیپ آسیای شرقی) می‌باشند درحالی‌که سویه‌های گزارش شده در نقاط دیگر دنیا، دارای CagA با آرایش EPIYA-A، EPIYA-B، EPIYA-C یا تیپ ABC (تیپ غربی) می‌باشند (۱۱) (شکل ۱، الف). همچنین نشان داده شده است بدلیل اتصال محکمتر EPIYA-D با SHP2 (نوعی پروتئین فسفاتاز که حاوی دومین SH2 است و در پیام‌رسانی سلول دخالت دارد) نسبت به EPIYA-C، سویه‌های شرق آسیا معمولاً قدرت سرطان‌زایی بیشتری را از خود نشان می‌دهند (۱۱). پروتئین CagA از طریق تیپ چهارم سیستم ترشحی به سلول‌های میزبان (سلول‌های اپی‌تلیال معده) وارد می‌شود (۱۲). به دنبال ورود به سلول، در ابتدا توسط کینازهای میزبانی (SFKs) *Src family kinases* و سپس بوسیله c-Abl در اسیدآمینه تیروزین فسفوریله می‌شود (۱۳، ۱۴). ورود توکسین CagA در سلول‌های میزبانی فنوتیپ تهاجمی را در سلول میزبان ایجاد می‌کند که بنام hummingbird مشهور است (شکل ۱، ب). تعدادی از مطالعات نشان داده است که این فنوتیپ تهاجمی در اثر فسفوریله شدن EPIYA در پروتئین CagA ایجاد می‌شود هرچند مکانیسم دقیق آن هنوز کاملاً مشخص نشده است (۱۵-۱۷). با فسفوریله شدن پروتئین CagA در موتیف‌های EPIYA، هر موتیف با توجه به توالی اسیدآمینه اطرافش، قابلیت برهم‌کنش با پروتئین‌های متفاوتی حاوی دومین SH2



شکل ۱- هلیکوباکتر پیلوری و انکوپروتئین CagA. الف: انواع تیپ های پروتئین CagA هلیکوباکتر پیلوری (۱۱، ۱۲). ب: Hummingbird فنوتیپ CagA در سلول های AGS معده (۱۵-۱۷). ج: مکانیسم عملکرد پروتئین CagA هلیکوباکتر پیلوری در سلول اپیتلیال معده (۱۳، ۱۴، ۱۸-۲۲، ۱۹).

Abl, Syk اسید امینه تیروزین موجود در سکانس های مورد نظر را فسفوریله می کنند (۲۷). نشان داده شده است که تیروزین فسفوریله شده در پروتئین حاوی آن اساسا در بازاریابی رشته های اکتین در سلول های میزبان که منجر به اندوستیوز باکتری می شود می تواند موثر باشد (۲۸) و با دامین SH2 (SHC1) برهم کنش می کنند. این برهم کنش باعث اختلال مسیر پیام رسانی Erk در سلول های آلوده به این باکتری می شود. همچنین برهم کنش Tarp-SHC1 باعث مقاومت سلول های آلوده نسبت به آپاتوز می شود که مکانیسم آن تاکنون شناخته نشده است (۲۹).

حضور EPIYA موتیف در توکسین LspA هموفیلوس دوکره ای و مکانیسم مولکولی آن در سلول میزبان

هموفیلوس دوکره ای یک باسیل گرم منفی است که

تیروزین فسفاتاز حاوی دامین SH2 است. SHP1 به مقدار زیاد در سلول های خون ساز بیان می شود و تصور می شود که بعنوان یک تنظیم کننده منفی در مسیرهای پیام رسانی سلول عمل کند (۲۴).

اهمیت EPIYA موتیف توکسین Tarp کلامیدیا تراکوماتیس و نقش آن در اختلال پیام رسانی سلول

کلامیدیا تراکوماتیس یک باکتری گرم منفی و داخل سلولی اجباری است و از طریق تماس جنسی منتقل می شود. توکسین این باکتری Tarp، از طریق سیستم ترشحاتی نوع سوم به داخل سلول های اپی تلیال منتقل می شود. موتیف های مشابه EPIYA یا ENIYE در توالیهای حفاظت شده ۵۰ اسیدامینه ای وجود دارد که به تعداد یک تا نه بار در انتهای N ترمینال Tarp تکرار شده اند (۲۵، ۲۶). کینازهای میزبانی مانند c- , SFKs

نقش EPIYA در توکسین Tir/اشرشیا کلی انتروپاتوژنیک و مکانیسم مولکولی آن در سلول میزبان

باکتری اشرشیا کلی انتروپاتوژنیک، توکسین Tir خود را از طریق سیستم ترشحی نوع سوم به سلول ایپی‌تلالیال روده وارد می‌کند و عامل ایجاد کننده اسپهال می‌باشد (۳۵). موتیف‌های شبه EPIYA یا EHIYD و VNPYA در بخش C ترمینال واقع شده‌اند و توسط تیروزین کینازهای میزبانی مانند c-Fyn و اعضای خانواده Abl مانند (Abl, Arg) فسفوریله می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که فسفوریله شدن تیروزین در EHIYD، در تشکیل پدستال (Pedestal) ضروری می‌باشد که بواسطه رشته‌های اکتین صورت می‌گیرد. تشکیل پدستال نقش مهمی در بیماری‌زایی EPEC ایفا می‌کند (۳۶، ۳۷). بعد از فسفوریله شدن تیروزین، پروتئین Tir قادر است که با پروتئین حاوی دمین NCK، SH2 بر هم‌کنش دهد که باعث تشدید پلی‌مریزه شدن اکتین می‌شود (۳۸-۴۰).

منشا احتمالی توالی‌های EPIYA باکتری‌ها از پروتئین‌های سلول میزبان

تاکنون در پستانداران پروتئین‌های زیادی شناخته شده‌اند که حاوی موتیف EPIYA می‌باشند و هنوز مکانیسم‌های عملکردی و فعالیت موتیف‌های مذکور در سلول نامشخص است. در میان این پروتئین‌ها، مکانیسم عملکردی موتیف EPIYA (یا شبه EPIYA) دو پروتئین به نام‌های Pragmin و P140Cap/SRC kinase signaling inhibitor 1 مشخص شده است که به بررسی جزئیات آنها می‌پردازیم (جدول ۲).

از طریق تماس جنسی منتقل می‌شود. این باکتری عامل بیماری شانکروئید است و باعث کاهش فعالیت فاگوسیتوزی در ماکروفاژها و گرانولوسیتها می‌شود. مکانیسمی که بواسطه مهار فعالیت SFK صورت می‌گیرد. LspA (Large supernatant protein A)، پروتئین باکتریایی است که به دو شکل LspA1، LspA2 می‌باشد. در ناحیه میانی آنها، توالی ۵۲ آمینواسیدی وجود دارد که حاوی موتیف مشابه به EPIYA یا EPIYG هستند. همچنین LspA1 دارای یک قطعه ۳۱۹ آمینواسیدی است که شامل دو موتیف مشابه به EPIYA یا EPVYA در انتهای C ترمینال می‌باشد در حالیکه LspA2 دارای سه موتیف EPVYA است (۳۱، ۳۰). موتیف‌های مذکور توسط SFKs در اسیدآمیننه تیروزین فسفوریله می‌شوند. نشان داده شده است که LspA قادر است فعالیت SFK را مهار کند و به نظر می‌رسد که CSK باعث مهار SFK می‌شود. البته جزئیات این امر هنوز روشن نشده است (۳۰-۳۳).

نقش سکانس EPIYA در توکسین Bep بارتونلا هنسلا و نقش آن در پیام‌رسانی سلول میزبان

بارتونلا هنسلا یک باکتری گرم منفی، داخل سلولی اختیاری است و عامل بیماری‌هایی مانند خراش گربه، انژیوماتوز باسیلر می‌باشد. توکسین‌های Bep A-Bep G این باکتری از طریق سیستم ترشحی نوع چهارم به سلول میزبان (سلول اندوتلیال عروقی) وارد می‌شوند (۳۴). به نظر می‌رسد که SFK مسئول فسفوریله شدن موتیف‌های شبه EPIYA یا EPLYA در BepE می‌باشد که در بخش N ترمینال واقع شده‌اند. نشان داده شده است که فسفوریله شدن موتیف‌های مذکور، باعث بر هم‌کنش توکسین BepE با پروتئین‌های حاوی دومین SH2، CSK و SHP2 می‌شود (۱۹).

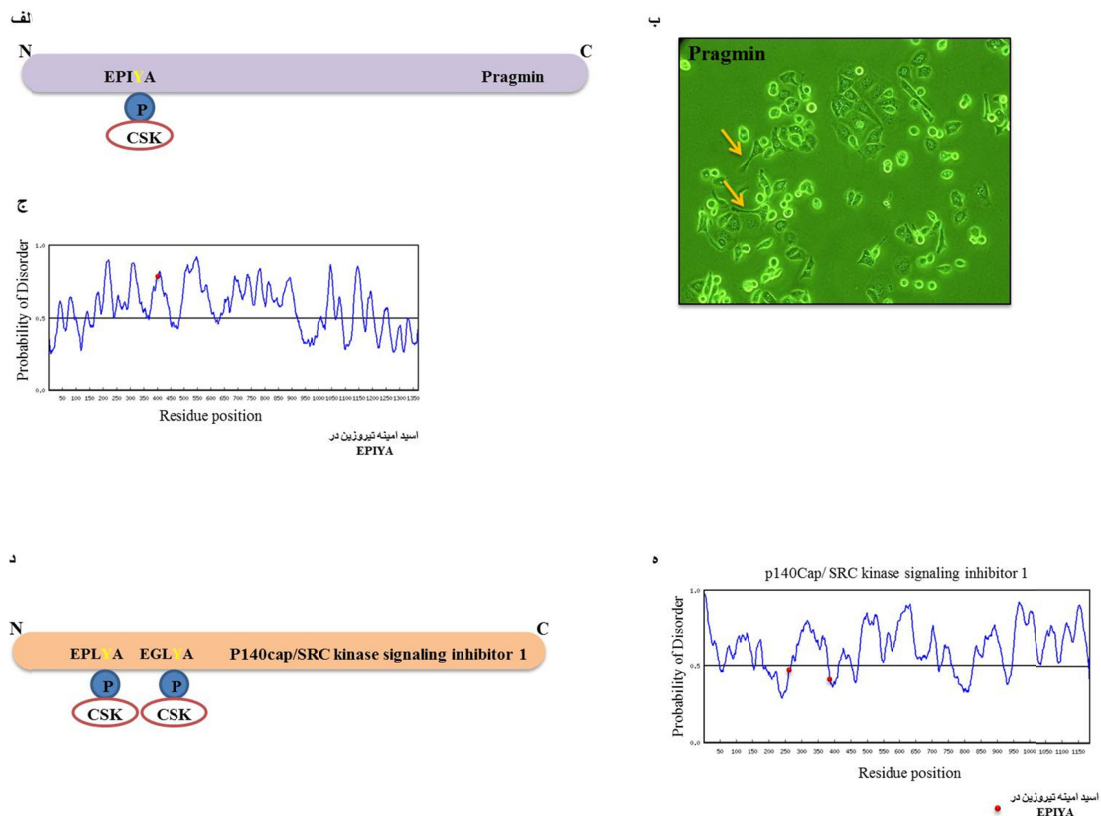
جدول ۲- پروتئین‌های میزبانی حاوی موتیف‌های EPIYA (یا شبه EPIYA) و تیروزین کینازهای فسفوریله کننده مربوطه.

| پروتئین حاوی SH2 دومین برهم‌کنش کننده با EPIYA | کیناز مسئول فسفوریله کردن تیروزین | سکانس‌های EPIYA (یا شبه EPIYA) | پروتئین‌های سلول پستانداران حاوی سکانس EPIYA (یا شبه EPIYA) با قابلیت عملکردی |
|---|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| CSK | EGFR, SFKs | EPIYA | Sgk223/۴۱، ۴) پرگمین |
| CSK | Abl | EPLYA, EGLYA | P140Cap/SRC kinase signaling inhibitor 1 (۴۴) |

مکانیسم ملکولی EPIYA موتیف در پرگمین (Pragmin/Sgk223)

زمانی که CSK در سیتوپلاسم مهار شده است و از آنجائیکه CSK مهار کننده منحصر به فرد برای Src می‌باشد، همین امر باعث افزایش فعالیت Src می‌شود (۴). مطالعات اخیر نشان داده است که فعالیت Src بعنوان کیناز فسفوریله کننده پرگمین منحصر شده است و در ایجاد فنوتیپ هجومی شکل سلول (فرم دراز شده سلول، شکل ۲، ب)، نقش اصلی را CSK ایفا می‌کند (۴۲، ۴۳). در چندین مطالعه به ارتباط میان پرگمین و سرطان زایی اشاره شده است و بخصوص بر نقش مهم موتیف EPIYA در بیماری زایی تاکید شده است. در همین ارتباط، نشان داده شده است که پرگمین فنوتیپ هجومی را در سلولهای سرطانی روده تشدید می‌کند که این امر وابسته به تیروزین فسفوریله شده‌ای است که در موتیف EPIYA واقع شده است (۶). در مطالعه دیگری هم که در رده سلولی PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma cell) صورت

پرگمین (Sgk223) یک کیناز کاذب (Pseudokinase) سیتوپلاسمی است که در بخش N ترمینال خود دارای یک موتیف EPIYA می‌باشد (شکل ۲، الف). موتیف EPIYA توسط تیروزین کیناز Src، CSK و یا در پاسخ به تحریک گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) فسفوریله می‌شود. فسفوریله شدن پرگمین در تیروزین موجود در موتیف مذکور، باعث برهم کنش میان پرگمین و CSK می‌شود. این برهم کنش مشابه به EPIYA-B موجود در توکسین CagA هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. جالب است که رقابت میان این موتیف‌ها برای برهم کنش با CSK در رده سلولی AGS نشان داده شده است (۴، ۴۱). این برهم کنش باعث مهار CSK در سیتوپلاسم می‌گردد. برای مهار فعالیت Src، CSK باید از سیتوپلاسم به غشا برود.



شکل ۲- پروتئین‌های میزبانی حاوی موتیف‌های EPIYA. الف: ساختار شماتیک پرگمین و محل موتیف EPIYA موجود در آن (۴، ۵). ب: فرم هجومی شده سلول بعد از ترانسفکشن سلول AGS با پروتئین پرگمین. ج: پیش بینی فرم انعطاف پذیر بودن EPIYA موتیف پرگمین (۵، ۴۴). د: ساختار شماتیک پروتئین P140cap/SRC kinase signaling inhibitor 1 و محل موتیف‌های مربوطه به آن (۴۴). ه: پیش بینی فرم انعطاف پذیر بودن موتیف‌های مذکور در پروتئین مربوطه (۴۴).

که با وجود حضور دو موتیف EPLYA و EGLYA در این پروتئین، همچنان شاهد برهم‌کنش اختصاصی هر دو موتیف مذکور فقط با CSK هستیم.

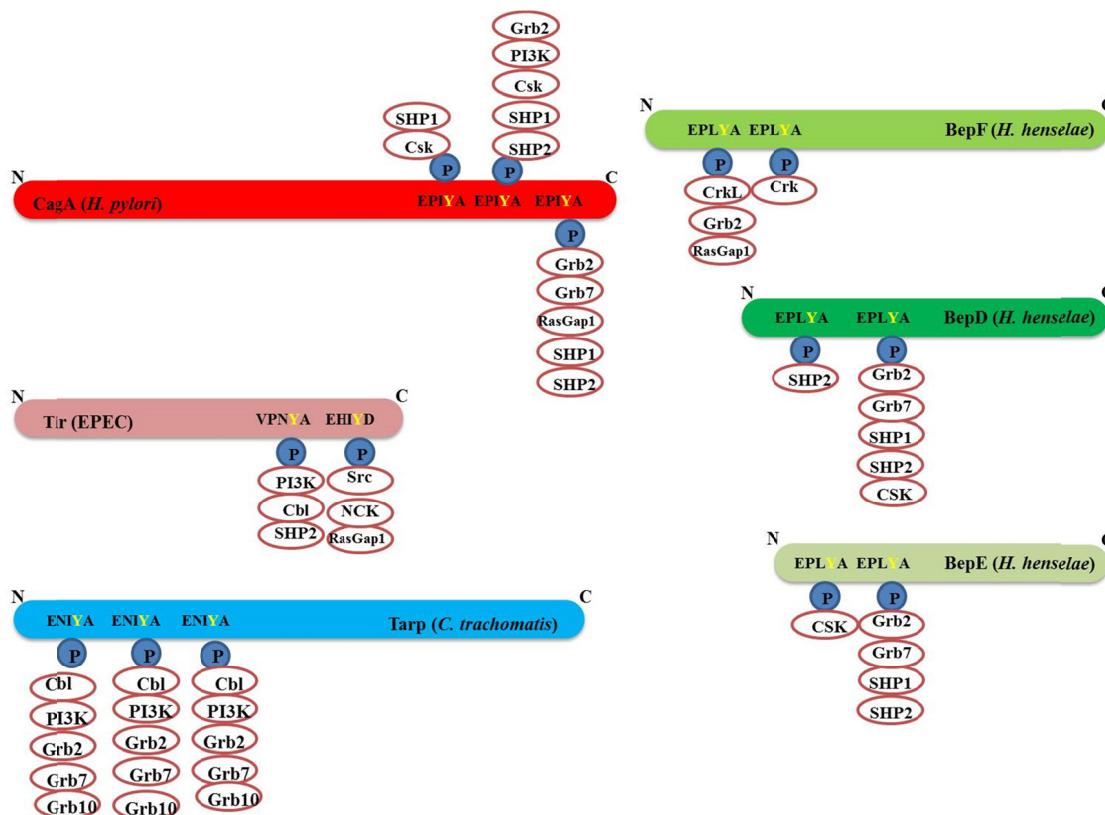
فرضیه شاه‌کلید بودن موتیف‌های EPIYA باکتریایی و مکانیسم‌های مولکولی آنها

در سال ۲۰۰۹، Selbach و همکاران نشان دادند که موتیف‌های EPIYA (یا شبه EPIYA) باکتریایی قادر هستند با تعداد زیادی پروتئین حاوی دامین SH2 در سلول میزبان برهم‌کنش نمایند. جالب است که برخی از این پروتئین‌ها برای اولین بار در این مطالعه گزارش شده‌اند (شکل ۳). آنها در تحقیق خود از یک پپتید سنتزی ۱۵ اسید آمینه‌ای حاوی موتیف EPxYAxV استفاده کردند در حالیکه X می‌تواند معرف هر نوع اسید آمینه‌ای باشد. بدین ترتیب آنها فرضیه‌ای را مبنی بر شاه‌کلید بودن موتیف‌های EPIYA باکتریایی (Master key hypothesis) مطرح نمودند. (۱۹). هدف ما از به‌کار بردن عبارت شاه‌کلید، بیان ویژگی مهم این موتیف‌ها در باز کردن درهای فراوان (که همان برهم

گرفته است، نشان داده شده که پرگمین در سطح بسیار بالایی بیان شده و همچنین موتیف EPIYA شدیداً فسفریله شده است (۷). جالب است که بدانیم نرم افزارهای پیش‌بینی خاصیت انعطاف‌پذیری در سکانس‌های پروتئینی، خاصیت انعطاف‌پذیری را در موتیف EPIYA پرگمین نشان می‌دهد (شکل ۲، ج).

مکانیسم مولکولی EPIYA موتیف در P140Cap/SRC kinase signaling inhibitor 1

پروتئین P140Cap (که بنام SRC kinase signaling inhibitor 1 نیز نامیده می‌شود) دارای دو موتیف مشابه EPIYA یا EPLYA و EGLYA در بخش N ترمینال می‌باشد. Abl، تیروزین‌کیناز اصلی در فسفریله شدن موتیف‌های EPLYA، EGLYA می‌باشد و این فسفریله شدن قادر می‌سازد که پروتئین مذکور با CSK برهم‌کنش نماید (۴۴) (شکل ۲، د). با کمک نرم افزارهای مربوطه عدم انعطاف‌پذیری برای پروتئین مذکور در هر دو موتیف شبه EPIYA پیش‌بینی شده است (شکل ۲، ه). جالب است



شکل ۳- فرضیه شاه‌کلید بودن موتیف‌های EPIYA در باکتریها و خلاصه‌ای از پروتئین‌های برهم‌کنش دهنده شناخته شده (۱۹).

یک ضرورت در تکامل موجودات پرسلولی مطرح می‌باشد و به شدت در سلسله حیوانات حفظ شده است (۵۱، ۵۲). بنابراین، اهمیت SFKs در سلول می‌تواند دلیل انتخاب شدن CSK بعنوان اولویت اول سلول در برهم‌کنش با موتیف‌های EPIYA موجود در پروتئین‌های میزبانی را توجیه کند.

نتیجه‌گیری

حضور گسترده و تکرار متوالی موتیف‌های EPIYA در میزبان‌های باکتریایی نشان از نقش‌های کلیدی و مهم این توالی‌ها در پیام‌رسانی سلولی دارد و اختلال در این مسیرهای پیام‌رسانی سلولی بخصوص در جهت بقاء باکتریها در سلول میزبان، به عنوان ضرورت بسیار مهم می‌باشد. همچنین، مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تکرار شدن متوالی موتیف‌های مذکور حاصل نوترکیبی همولوگ از توالی‌های نوکلوتیدی کدکننده قطعات مذکور در توکسین‌های باکتریایی می‌باشد (۵۳، ۵۴) و با توجه به خاصیت انعطاف پذیری موتیف‌های مورد نظر، برهم‌کنش‌های متعددی با پروتئین‌های میزبانی را توسط آنها شاهد هستیم. در واقع، این خاصیت انعطاف‌پذیری باعث می‌شود که این توالی‌های مهم به راحتی در معرض کینازهای میزبانی قرار گرفته، فسفریله شوند و به آسانی با تعداد زیادی پروتئین‌های حاوی دمین SH2 برهم‌کنش نمایند حال آنکه در پروتئین‌های میزبانی حاوی این موتیف‌ها، تکرار متوالی موتیف‌ها شدیداً مهار شده است (۵) و بنابر دلایلی که هنوز روشن نمی‌باشد تمایل برهم‌کنش موتیف‌های مورد نظر با طیف وسیع پروتئین‌های حاوی SH2 به شدت کاهش یافته است. این امر از مضر بودن موتیف‌های مورد نظر برای سلول و نهایتاً کنترل شدید مسیرهای پیام‌رسانی در برخورد با این موتیف‌ها در سلولهای میزبان نشان دارد. از سوی دیگر نشان داده شده است که تعداد پروتئین‌های میزبانی حاوی موتیف‌های مذکور بسیار زیاد است اما تعداد اندکی از این پروتئین‌ها در موتیف‌های مذکور فسفریله می‌شوند (۵). دلایل این امر هنوز روشن نشده است اما به نظر می‌رسد که ساختار موتیف‌ها در این پروتئین‌ها فاقد ساختار انعطاف‌پذیری است که در توکسین‌های باکتریایی موجود می‌باشد. تا کنون مکانیسم‌های

کنش با پروتئین‌های حاوی SH2 و اختلال در مسیرهای پیام‌رسانی سلول) می‌باشد. بعبارت دیگر، برهم‌کنش میان اسید آمینه تیروزین فسفریله شده (همراه با تاثیر اسید آمینه‌های اطراف) با هر یک از پروتئین‌های حاوی SH2 به مثابه برهم‌کنش میان قفل و کلید است و کاملاً اختصاصی می‌باشد. مطالعات متعددی نشان داده است که فقدان تاخوردگی و عدم شکل ثابت و وجود خاصیت انعطاف‌پذیری در موتیف‌های مختلف پروتئین‌ها مانند موتیف‌های EPIYA، می‌تواند سبب برهم‌کنش فراوان توالی‌های مورد نظر با پروتئین‌های متفاوت شود (۴۵-۴۷). در همین ارتباط، نشان داده شده است که پروتئین TIR در EPEC فاقد تاخوردگی می‌باشد و ساختار انعطاف‌پذیری دارد (۴۸). مطالعات دیگری نیز وجود خاصیت انعطاف‌پذیری را در موتیف‌های EPIYA هلیکوباکتری پیلوری نشان می‌دهد (۴۹، ۵۰). این خاصیت ساختاری موجود در موتیف‌های EPIYA توکسین‌های باکتریایی، قابلیت شاه کلید بودن موتیف‌های مذکور را می‌تواند تا حدودی توجیه نماید.

از سوی دیگر در سال ۲۰۱۱، برای اولین بار حضور موتیف EPIYA با قابلیت عملکردی در پروتئین میزبانی پرگمین شناسایی شد. در این مطالعه، صفری و همکاران دریافتند که موتیف EPIYA پرگمین همانند توکسین‌های باکتریایی حاوی این موتیف‌ها، قادر به برهم‌کنش با تعداد زیادی پروتئین‌های حاوی SH2 نمی‌باشد و میان‌کنش اسید آمینه تیروزین فسفریله شده تنها با CSK می‌باشد که کاملاً اختصاصی است (۴). در سالهای بعد تعداد بیشتری از پروتئین‌هایی که دارای موتیف‌های EPIYA هستند، یافت شد که این امر حضور گسترده این موتیف‌ها را در پروتئین‌های میزبانی نشان می‌دهد (۵). تا کنون، دلیل اختصاصی بودن برهم‌کنش میان موتیف‌های EPIYA پروتئین‌های میزبانی فقط با یک پروتئین حاوی SH2 و ترجیحاً CSK مشخص نیست. به نظر می‌رسد که نقش منحصر به فرد CSK در مهار SFKs دلیل این انتخاب است. SFKs بعنوان یک خانواده تیروزین کینازی تقریباً در بیشتر مسیرهای پیام‌رسانی سلول تاثیرگذار می‌باشند و نقش‌های کلیدی متعددی در تنظیم مراحل مختلف سلولی را نیز دارا هستند. حضور SFKs بعنوان

the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews Cancer*; 2004.4(9):688-94.

12. Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Journal of Experimental Medicine*; 2000.191(4):587-592.

13. Poppe M, Feller S, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*; 2007.26(24):3462-72.

14. Tammer I, Brandt S, Hartig R, König W, Backert S. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*; 2007.132(4):1309-19.

15. Bourzac KM, Botham CM, Guillemin K. *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infection and immunity*; 2007.75(3):1203-13.

16. Segal E, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1999.96(25):14559-64.

17. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *The EMBO journal*; 2003.22(3):515-28.

18. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *Journal of Biological Chemistry*; 2003.278(6):3664-70.

19. Selbach M, Paul FE, Brandt S, Guye P, Daumke O, Backert S, et al. Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Cell host & microbe*; 2009.5(4):397-403.

20. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*; 2002.295(5555):683-6.

21. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2002.99(22):14428-33.

22. Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *Journal of Experimental Medicine*; 2005.202(9):1235-47.

23. Lin M, Dulk-Ras D, Hooykaas PJ, Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* Anka secreted by

کنترل کننده‌ای که در جهت اختصاصی عمل کردن موتیف‌ها در پروتئین‌های میزبانی باشد، گزارش نشده است. روشن شدن این مکانیسم‌ها نیز می‌تواند در طراحی استراتژی‌های درمانی استفاده شود که با کمک آنها می‌توان در جهت محدود کردن برهم‌کنش‌های باکتریایی با پروتئین‌های میزبانی و بنابراین در مهار بیماری‌های زایی قدم برداشت.

References

1. Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(2):137-149.

2. Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444(7119): 567-573.

3. Backert S, Selbach M. Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol*; 2005;13(10):476-84.

4. Safari F, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M. Mammalian Pragmin regulates Src family kinases via the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motif that is exploited by bacterial effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2011.108(36):14938-43.

5. Safari F. EPIYA (or-like) motifs in mammalian proteins. *Journal of King Saud University-Science*; 2014.26(4):276-284.

6. Leroy C, Fialin C, Sirvent A, Simon V, Urbach S, Poncet J, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that mediates SRC invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer research*; 2009.69(6):2279-86.

7. Tactacan CM, Phua YW, Liu L, Zhang L, Humphrey ES, Cowley M, et al. The pseudokinase SgK223 promotes invasion of pancreatic ductal epithelial cells through JAK1/Stat3 signaling. *Molecular cancer*; 2015.14(1):139.

8. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*; 2005.55(2):74-108.

9. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1996.93(25):14648-53.

10. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece C, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology*; 1998.28(1):37-53.

11. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of

24. type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cellular microbiology*; 2007.9(11):2644-57.
25. IJdo JW, Carlson AC, Kennedy EL. Anaplasma phagocytophilum AnkA is tyrosine-phosphorylated at EPIYA motifs and recruits SHP-1 during early infection. *Cellular microbiology*; 2007.9(5):1284-96.
26. Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, et al. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 2004.101(27):10166-71.
27. Clifton DR, Dooley CA, Grieshaber SS, Carabeo RA, Fields KA, Hackstadt T. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infection and immunity*; 2005.73(7):3860-8.
28. Lutter EI, Bonner C, Holland MJ, Suchland RJ, Stamm WE, Jewett TJ, et al. Phylogenetic analysis of Chlamydia trachomatis Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infection and immunity*; 2010.78(9):3678-88.
29. Mehlitz A, Banhart S, Hess S, Selbach M, Meyer TF. Complex kinase requirements for Chlamydia trachomatis Tarp phosphorylation. *FEMS microbiology letters*; 2008.289(2):233-40.
30. Mehlitz A, Banhart S, Mäurer AP, Kaushansky A, Gordus AG, Zielecki J, et al. Tarp regulates early Chlamydia-induced host cell survival through interactions with the human adaptor protein SHC1. *The Journal of cell biology*; 2010.190(1):143-57.
31. Mock JR, Vakevainen M, Deng K, Latimer JL, Young JA, Van Oers NS, et al. Haemophilus ducreyi targets Src family protein tyrosine kinases to inhibit phagocytic signaling. *Infection and immunity*; 2005.73(12):7808-16.
32. Vakevainen M, Greenberg S, Hansen EJ. Inhibition of phagocytosis by Haemophilus ducreyi requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. *Infection and immunity*; 2003.71(10):5994-6003.
33. Ward CK, Lumbley SR, Latimer JL, Cope LD, Hansen EJ. Haemophilus ducreyi secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *Journal of bacteriology*; 1998.180(22):6013-22.
34. Deng K, Mock JR, Greenberg S, Van Oers NS, Hansen EJ. Haemophilus ducreyi LspA proteins are tyrosine phosphorylated by macrophage-encoded protein tyrosine kinases. *Infection and immunity*; 2008.76(10):4692-702.
35. Schulein R, Guye P, Rhomberg TA, Schmid MC, Schröder G, Vergunst AC, et al. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of Bartonella henselae into human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 2005.102(3):856-61.
36. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*; 1997.91(4):511-20.
37. Phillips N, Hayward RD, Koronakis V. Phosphorylation of the enteropathogenic E. coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nature cell biology*; 2004.6(7):618-25.
38. Swimm A, Bommarius B, Li Y, Cheng D, Reeves P, Sherman M, et al. Enteropathogenic Escherichia coli use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Molecular biology of the cell*; 2004.15(8):3520-9.
39. Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Molecular microbiology*; 1999.31(4):1229-41.
40. Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, et al. Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature cell biology*; 2001.3(9):856-9.
41. Campellone KG, Giese N, Tipper OJ, Leong JM. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic Escherichia coli Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Molecular microbiology*; 2002.43(5):1227-41.
42. Senda Y, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M. C-terminal Src kinase-mediated EPIYA phosphorylation of Pragmin creates a feed-forward C-terminal Src kinase activation loop that promotes cell motility. *Cancer science*; 2016.107(7):972-80.
43. Safari F, Jodeiry Zaer S. Evaluation of Cell-Morphological Changes by Helicobacter pylori CagA and Pragmin in AGS Human Gastric Carcinoma Cells. *Gene Cell Tissue*; 2017.4(2):e12598.
44. Safari F, Jodeiry Zaer S. Down regulation of Src Family Kinase Activity Using PP2 Inhibitor Has No Effect on the Elongation of Pragmin-Transfected Adenocarcinoma AGS cells. *International Journal of Basic Science in medicine*; 2018.3(1):46-50.
45. Repetto D, Aramu S, Erba EB, Sharma N, Grasso S, Russo I, et al. Mapping of p140Cap phosphorylation sites: the EPLYA and EGLYA motifs have a key role in tyrosine phosphorylation and Csk binding, and are substrates of the Abl kinase. *PloS one*; 2013.8(1):e54931.
46. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically

unstructured proteins and their functions. *Nature reviews Molecular cell biology*; 2005.6(3):197-208.

47. Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. Function and structure of inherently disordered proteins. *Current opinion in structural biology*; 2008.18(6):756-64.

48. Sigalov AB. Protein intrinsic disorder and oligomericity in cell signaling. *Molecular bioSystems*; 2010.6(3):451-61.

49. Race PR, Solovyova AS, Banfield MJ. Conformation of the EPEC Tir protein in solution: investigating the impact of serine phosphorylation at positions 434/463. *Biophysical journal*; 2007.93(2):586-96.

50. Neić D, Miller MC, Quinkert ZT, Stein M, Chait BT, Stebbins CE. Helicobacter pylori CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nature structural & molecular biology*; 2010.17(1):130-2.

51. Hayashi T, Senda M, Morohashi H, Higashi H, Horio M, Kashiba Y, et al. Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of Helicobacter pylori oncogenic effector CagA. *Cell host & microbe*; 2012.12(1):20-33.

52. Segawa Y, Suga H, Iwabe N, Oneyama C, Akagi T, Miyata T, et al. Functional development of Src tyrosine kinases during evolution from a unicellular ancestor to multicellular animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2006.103(32):12021-6.

53. Okada M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int J Biol Sci*; 2012.8(10):1385-97.

54. Furuta Y, Yahara K, Hatakeyama M, Kobayashi I. Evolution of cagA oncogene of Helicobacter pylori through recombination. *PloS one*; 2011.6(8):e23499.

55. Majazki J, Wüppenhorst N, Hartelt K, Birtles R, von Loewenich FD. Anaplasma phagocytophilum strains from voles and shrews exhibit specific ankA gene sequences. *BMC veterinary research*; 2013.9(1):235.