

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση της φωσφορυλίωσης της CagA πρωτεΐνης του Helicobacter pylori στη μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

> ΙΩΑΝΝΑ ΣΟΥΓΛΕΡΗ ΧΗΜΙΚΟΣ

> > ΑΘΗΝΑ

ΜΑΙΟΣ 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση της φωσφορυλίωσης της CagA πρωτεΐνης του Helicobacter pylori στη μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

ΙΩΑΝΝΑ ΣΟΥΓΛΕΡΗ ΧΗΜΙΚΟΣ

AOHNA

ΜΑΙΟΣ 2013

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση της φωσφορυλίωσης της CagA πρωτεΐνης του *Helicobacter pylori* στη μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

ΙΩΑΝΝΑ ΣΟΥΓΛΕΡΗ

A.M.: 61108

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Μαυρή-Βαβαγιάννη Μαίρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαυρή-Βαβαγιάννη Μαίρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ, Σγούρας Διονύσιος, Κύριος Ερευνητής στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Γαλανοπούλου Ντία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 13/06/2013

Περίληψη

To Helicobacter pylori (H. pylori) είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο το οποίο ενδημεί στο γαστρικό βλεννογόνο των ανθρώπων και ευθύνεται για την ανάπτυξη χρόνιας γαστρικής φλεγμονής (γαστρίτιδας) και πεπτικού έλκους, αυξάνει δε τον κίνδυνο για την εμφάνιση γαστρικού αδενοκαρκινώματος στους ενήλικες. Η παθογένεια του βακτηρίου εκδηλώνεται μέσω ενός αριθμού λοιμογόνων παραγόντων, με κυριότερο αντιπρόσωπο την βακτηριακή ογκοπρωτεΐνη CagA. Μετά την πρόσφυση του Η. pylori στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, η πρωτεΐνη CagA μεταφέρεται μέσω ενός συστήματος μεταφοράς τύπου IV ενδοκυττάρια, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας και την επαγωγή χαρακτηριστικού φαινοτύπου "διασποράς και επιμήκυνσης" που προσομοιάζει στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή. Κομβικό ρόλο στη δράση της πρωτεΐνης CagA παίζουν οι θέσεις φωσφορυλίωσης τυροσίνης (Υ) που μετέχουν σε επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες γλουταμινικού οξέος-προλίνηςισολευκίνης-τυροσίνης-αλανίνης (EPIYA) και βρίσκονται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ο τύπος και ο αριθμός των μοτίβων ΕΡΙΥΑ έχει δειχθεί ποικίλλει στα κλινικά στελέχη και συσχετίζεται με βαρύτερες ÓΤΙ ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στους ενήλικες. Στη παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την εν δυνάμει εμπλοκή της ρωτεΐνης CagA, στην μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιστικής μεταλλοπρωτεϊνάσης-3 (MMP-3) σε μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών πειραματική in vitro κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν ισογενή μεταλλάγματα του στελέχους αναφοράς H. pylori P12 που εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με διαφορετικό αριθμό, αφενός λειτουργικών θέσεων φωσφορυλίωσης **EPIYA** και αφετέρου µnφωσφορυλιώσιμων θέσεων EPIFA μετά από αντικατάσταση της τυροσίνης (Y) με φαινυλαλανίνη (F). Η ενεργοποίηση του γονιδίου της MMP-3 μετρήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό του m-RNA μέσω συγκριτικής ποσοτικής Real Time PCR. Επιπλέον, προσδιορίσαμε με ανοαποτύπωση κατά Western, την ολική έκφραση της MMP-3 σε πρωτεϊνικά κυτταρολύματα αλλά και την εκκριθείσα ΜΜΡ-3 στα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου της

MMP-3 παρουσία έκφρασης της Πρωτεΐνης CagA, ευθέως ανάλογης προς τον αριθμό των τελικών ΕΡΙΥΑ θέσεων φωσφορυλίωσης. Αντίθετα, αδυναμία φωσφορυλίωσης της CagA στις θέσεις ΕΡΙΥΑ είχε σαν αποτέλεσμα τη μηδαμινή ενεργοποίηση της MMP-3. Έκφραση της ολικής πρωτεΐνης MMP-3, στα πρωτεΐνικά κυτταρολύματα φαίνεται να εξαρτάται από την έκφραση CagA όχι όμως από τη φωσφορυλίωση της στις θέσεις ΕΡΙΥΑ. Αντίθετα, τα επίπεδα της εκκριθείσας MMP-3 στα υπερκείμενα φαίνεται να εξαρτώνται και από τη φωσφορυλίωσή της CagA στις θέσεις ΕΡΙΥΑ. Μέτρηση της κασεϊνολυτικής δραστηριότητας με ζυμογραφία στα υπερκείμενα, έδειξε ότι πράγματι, η δραστηριότητα MMP-3 φαίνεται να εξαρτάται από την λειτουργική φωσφορυλίωση της CagA στις θέσεις ΕΡΙΥΑ. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ένα εν δυνάμει καινούργιο μοντέλο όγκο-γεννητικής δράσης της Πρωτεΐνης CagA.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βακτηριακή παθογένεια

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ελικοβακτήριο του πυλωρού, CagA, μεταλλοπρωτεϊνάσες του ιστού, στρωμελυσίνη-1

Abstract

Helicobacter pylori (H. pylori) is a gram-negative bacterium which is endemic in the human gastric mucosa. It has been proven to be the determining factor for the development of chronic gastric inflammation (gastritis) and peptic ulcer and has been shown to increase the risk for the occurrence of gastric adenocarcinoma in adults. The bacteria manifest its pathogenic role through the activity of a variety of virulence factors and the CagA protein is one of the major virulence determinants. Following H. pylori adhesion to gastric epithelial cells, CagA protein is translocated endocellularly, through a type IV bacterial secretion system and deregulates key signaling pathways related to cellular polarity and the induction of a scattering phenotype that resembles to the epithelial to mesenchymal transition. Pivotal role in the induction of such phenomena by CagA protein, plays its hierarchic phosphorylation by intracellular kinases at tyrosine phosphorylation sites (Y) involved in repetitive glutamic acid-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) peptide sequences. The type and number of EPIYA motifs at the carboxy-terminus of CagA has been observed to vary in clinical strains and has been reported to be associated with more severe histopathological lesions in adults. In this study, we investigated the potential involvement of *H. pylori* CagA protein, in the transcriptional activation of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in an in vitro experimental infection model of gastric epithelial cells (AGS). A number of isogenic mutants of H. pylori P12 reference strain were utilized, expressing CaqA protein with a variable number of functional EPIYA and phosphorylation-deficient EPIFA motifs. MMP-3 gene activation was determined by quantitative Real Time PCR. Furthermore, the expression of MMP-3 protein in total H. pylori-infected epithelial cell lysates as well as secreted MMP-3 in the culture supernatants was determined by Western Blot. In addition, secreted MMP-3 caseinolytic activity in the supernatants of H. *pylori*-infected epithelial cells was determined by zymography. An increase of the transcriptional activity of the MMP-3 gene was observed in the presence of CagA protein and found to be proportional to the number of terminal functional EPIYA motifs. In contrast, phosphorylation-deficient CagA induced

MMP-3 activation at background levels. The expression of total MMP-3 protein, in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells, appeared to be in part, depended upon CagA expression, but not on the phosphorylation on EPIYA motifs, as bacterial mutants with CagA phosphorylation-functional EPIYA or phosphorylation-deficient EPIFA domains induced the same levels of total MMP-3 protein. In contrast, levels of secreted MMP-3 in the supernatants of *H. pylori*-infected gastric epithelial cells, was observed to depend upon EPIYA phosphorylation of CagA. MMP-3 levels of caseinolytic activity measured in the *H. pylori*-infected epithelial cell supernatants showed that indeed, MMP-3 caseinolytic activity depended upon phosphorylation of the functional EPIYA motifs of CagA protein. These results point out to a new potential tumorigenic role of the bacterial CagA protein.

SUBJECT AREA: Bacterial Pathogenesis

KEYWORDS: Helicobacter pylori, CagA, matrix metalloproteinases, stromelysin-1

Στους γονείς μου, στην αξιολάτρευτη γιαγιά μου & τον φίλο μου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν ουσιαστικά, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Αρχικά οφείλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της ερευνητικής εργασίας Δρ. Διονύση Σγούρα του Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για τη συμπαράσταση και τη καθοδήγησή του όλο αυτό τον καιρό. Χωρίς τις πολύτιμες συμβουλές και τη θετική του διάθεση τα πράγματα δεν θα είχαν γίνει έτσι όπως τα ήθελα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ανδρέα Μεντή, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας που μου έδωσε και με δέχτηκε στο εργαστήριο.

Ο δεύτερος άνθρωπος, στον οποίο οφείλω την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, διότι χωρίς εκείνη δεν θα μπορούσα να το παρουσιάσω αλλά και να συμμετέχω σε αυτό, είναι η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική στην πραγματοποίηση της εργασίας μου και την ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά που δέχτηκε να είναι επιβλέπουσα της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω στον Κώστα Παπαδάκο, αλλά και στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους στα πειράματα μου αλλά και στη συγγραφή της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τον φίλο μου, που με έκανε να γελάω και να ξεχνιέμαι τις δύσκολες και αγχώδεις στιγμές του μεταπτυχιακού μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, αξίζει στον αείμνηστο καθηγητή μου Κωνσταντίνο Δραΐνα, ο οποίος με βοήθησε με τη πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τα προπτυχιακά μου χρόνια και συνέβαλε με την επιρροή του στις επιλογές μου Τέλος, στους γονείς μου οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ, γιατί πίστευαν από την πρώτη στιγμή ότι μπορώ να τα καταφέρω και γιατί στάθηκαν δίπλα μου με αγάπη και υπομονή, τόσο στα καλά, όσο και στα δύσκολα, προσπαθώντας κάθε στιγμή να με εμψυχώνουν.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1 Γενικά για τη λοίμωξη από Η.pylori	23
1.1.1 Βιολογία του <i>Η. pylori</i>	23
1.1.2 Γονιδίωμα του <i>Η. pylori</i>	24
1.1.3 Παθογένεια του <i>Η. pylori</i>	24
1.2 Γαστρικός Καρκίνος	28
1.2.1 Τύποι γαστρικού καρκίνου	28
1.3 Παράγοντες παθογένειας του <i>Η. pylori</i>	30
1.3.1 Vacuolating-cytotoxin A (VacA)	
1.3.2 Μόρια Προσκόλλησης και Εξωτερικές Μεμβρανικές	Πρωτεΐνες
(OMPs)	32
1.3.3 Νησίδιο παθογένειας cag (cagPAI)	34
1.3.4 Παράγοντας Παθογένειας CagA	36
1.4 Οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες (ΜΜΡ)	41
1.4.1 Η εξωκυττάρια ύλη	41
1.4.2 Κριτήρια ένταξης στην οικογένεια των Μεταλλοπρωτ	εϊνασών.42
1.4.3 Ταξινόμηση των Μεταλλοπρωτεϊνασών	43
1.4.4 Ρύθμιση της έκφρασης των Μεταλλοπρωτεϊνασών	45
1.4.5 Η ενεργοποίηση των Μεταλλοπρωτεϊνασών	46
1.4.6 Η λειτουργία των Μεταλλοπρωτεϊνασών	47
1.4.7 Στρωμελυσίνη 1 ή Μεταλλοπρωτεϊνάση 3 (ΜΜΡ-3)	47
1.4.8 Στρωμελυσίνη 1 και Ελικοβακτήριο του πυλωρού	50
1.4.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας	51
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.1 Στελέχη <i>Η. pylori</i> που χρησιμοποιήθηκαν	53
2.1.1 Καλλιέργεια στελεχών Η. pylori	53

2.1.2 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ευκαρυωτικών κυττάρων.	54
2.2 Κρυο-συντήρηση	54
2.2.1 Κρυο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	54
2.2.2 Κρυο-συντήρηση στελεχών Η. pylori	55
2.3 Απομόνωση Νουκλεϊνικών οξέων	55
2.3.1 Απομόνωση γονιδιακού DNA βακτηρίων	55
2.3.2 Απομόνωση ολικού RNA	56
2.4 Μέθοδοι αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	56
2.4.1 Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA	56
2.4.2 Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού	
χρόνου (Quantitative Real Time PCR)	57
2.5 In vitro μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων	57
2.6 Ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών και ενζυματικής	
δραστηριότητας	58
2.6.1 Λύση κυττάρων	58
2.6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	59
2.6.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western	60
2.6.4 Ανίχνευση ενζυμικής δραστικότητας με ζυμόγραμμα	62
2.7 Σήμανση <i>Η. pylori</i> με CFDA-SE	63
2.8 Ανοσοφθορισμός και Συνεστιακή Μικροσκοπία	63
2.9 Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής	63
2.10 Υπολογισμός ρυθμού ανάπτυξης του βακτηριακού	
πληθυσμού	65
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1 Επιλογή λειτουργικών μεταλλαγμένων βακτηρίων	67
3.1.1 Επιλογή στελεχών με βάση την ικανότητα έκφρασης της	
πρωτεΐνης CagA	67

3.1.2 Αξιολόγηση του βακτηριακού ρυθμού ανάπτυξης68
3.1.3 Προσδιορισμός του ποσοστού προσκόλλησης των βακτηρίων
στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα69
3.1.4 Προσδιορισμός της λειτουργικότητας του τύπου ΙV βακτηριακού
εκκριτικού συστήματος, της επιτυχούς μεταφοράς της CagA στο
εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και της
φωσφορυλίωσης της σε θέσεις τυροσίνης71
3.2 Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις ΕΡΙΥΑ-C
συμβάλλει στην μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1
(MMP-3)
3.2.1 Επίδραση της πρωτεΐνης CagA στην έκφραση της MMP-3 σε
κυτταρολύματα AGS κυττάρων75
3.2.2 Επίδραση των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C, της
πρωτεΐνης CagA, στην έκφραση της MMP-3 στα υπερκείμενα AGS
κυττάρων76
3.2.3 Επίδραση της φωσφορυλίωσης σε θέσεις ΕΡΙΥΑ-C της
πρωτεΐνης CagA, στην ενζυμική δραστηριότητα της MMP-3 στα
υπερκείμενα AGS κυττάρων78
4. 2YZHIHZH80
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ87
ΑΝΑΦΟΡΕΣ91

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Η προσκόλληση των CFDA-SE-σημασμένων *Η. pylori* μεταλλαγμένων στελεχών επάνω σε κύτταρα AGS προσδιορίστηκε με ανάλυση FACS. Η προσκόλληση (%) αναφέρεται στο ποσοστό των κυττάρων AGS τα οποία ανιχνεύθηκαν να φέρουν δεσμευμένο επάνω τους φθορίζοντα βακτηρίδια..... 70

Σχήμα 2: Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της MMP-3 σε AGS κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η μεταγραφική ενεργοποίηση καθορίστηκε με την χρήση Quantitative Real Time PCR σε 2, 4 και 24h ώρες μετά την μόλυνση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student ttest και τα επίπεδα σημαντικότητας συμβολίζονται ως εξής *<0.005, **<0.01, ***<0.05.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 17: Ζυμόγραμμα καζεΐνης όπου παρατηρείται δράση της ΜΜΡ-3 στα	x 57
kDa και δράση της MMP-7 στα 21 kDa	. 78

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR) 57

Πίνακας 5. Οι ρυθμοί ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών H. pylori...... 69

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ σε συνεργασία με το τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2011 – Ιουνίου 2013. Η εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ήταν ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της ζωής μου, καθώς έμαθα καινούριες εργαστηριακές τεχνικές, είδα στην πράξη όλα όσα είχα ακούσει τα τελευταία χρόνια στα προπτυχιακά αλλά και μεταπτυχιακά μαθήματα και διεύρυνα τους ορίζοντές μου.

Από το 2007 μέχρι το 2011 φοίτησα στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Το καλοκαίρι του 2011, τέλεσα την υποχρεωτική προπτυχιακή πρακτική μου εργασία στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με υπεύθυνο τον Δρ. Διονύση Σγούρα και από τότε μέχρι σήμερα είμαι εγγεγραμμένη στο μεταπτυχιακό του τμήματος Χημείας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την εργαστηριακή επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Δρ. Μαυρή-Βαβαγιάννη Μαίρης και του Δρ. Διονύση Σγούρα στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Εθληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Θέμα της ερευνητικής μεταπτυχιακής διατριβής μου είναι "Επίδραση της φωσφορυλίωσης της Πρωτεΐνης CagA του *Helicobacter pylori* στη μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα".

Δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είναι αυθεντική εξ' ολοκλήρου και δεν περιέχει υλικό δημοσιευμένο από άλλους συγγραφείς, εκτός των περιπτώσεων όπου αναφέρονται οι ανάλογες βιβλιογραφίες. Επιπλέον, κανένα μέρος εργασίας αυτής δεν έχει υποβληθεί για την απονομή οποιουδήποτε τίτλου από άλλο ερευνητικό ίδρυμα.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά για τη λοίμωξη από Η.pylori

Η απομόνωση του Helicobacter pylori (H. pylori) από γαστρικές βιοψίες ασθενών έγινε πρώτη φορά από τους Warren και Marshall το 1983 (8), αν και είχε ήδη περιγραφεί, από το 1893, η παρουσία ενός σπειροειδούς βακτηρίου σε στομάχια κουνελιών (9). Στον άνθρωπο, παρουσία σπειροειδών βακτηρίων σε καρκινώματα γαστρικών αδένων περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1906 (10) ενώ το 1975 αναφέρθηκε η ύπαρξη σπειροειδών βακτηρίων σε γαστρικές βιοψίες ασθενών με έλκος στομάχου (11). Η ανακάλυψη του H. pylori επηρέασε καθοριστικά την ειδικότητα της γαστρεντερολογίας διότι απέδειξε ότι το πεπτικό έλκος είναι ένα λοιμώδες νόσημα, άλλαζοντας ριζικά τον τρόπο θεραπευτικής αντιμετώπισής του. Για το λόγο αυτό οι Warren και Marshall τιμήθηκαν με το Nobel Ιατρικής το 2005 (12).

1.1.1 Βιολογία του *Η. pylori*

Το *H. pylori* είναι ένα Gram αρνητικό μικροαερόφιλο σπειροειδές βακτήριο, το οποίο για την κίνησή του χρησιμοποιεί 2-6 πολικά μαστίγια, εξωτερικής διαμέτρου 30 nm, μήκους 2.5-4.0 μm και πλάτους 0.5-1.0 μm (13). Η συνήθης μορφολογία του βακτηρίου είναι σπειροειδής, ενώ το βακτήριο μπορεί να εμφανίζεται και ως απλός βάκιλος, ή και υπό συνθήκες stress να αποκτά κοκκοειδή μορφολογία in vitro και in vivo. Ειδικότερα, η κοκκοειδής μορφολογία συσχετίστηκε με την ανθεκτική μορφή του βακτηρίου αλλά και με περιορισμένη βιωσιμότητα (14-17). Σε περιβαλλοντικά δείγματα, η εν λόγω μορφή διαπιστώνεται από πρόσφατες μελέτες (16, 18) ότι αποτελεί τον κυρίαρχο τύπο του βακτηρίου, στο πόσιμο νερό (19) και σε τρόφιμα (20), καθιστώντας την, εν δυνάμει, μια πιθανή δεξαμενή στελεχών για περαιτέρω μόλυνση στον άνθρωπο. Οι καλλιέργειες του βακτηρίου δίνουν θετικές αντιδράσεις για την ύπαρξη ουρεάσης, καταλάσης και οξειδάσης, η παρουσία των οποίων χρησιμοποιείται για την εργαστηριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου (21). Το *H. pylori,* σε αντίθεση με άλλους ιούς και βακτήρια, μπορεί και επιβιώνει στο εξαιρετικά όξινο περιβάλλον του στομάχου του ξενιστή μέσω του συστήματος ουρεάσης το οποίο μετατρέπει την ουρία σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ουδέτερου περιβάλλοντος κατάλληλου για την επιβίωση του βακτηρίου (21).

1.1.2 Γονιδίωμα του *Η. pylori*

Το γονιδίωμα του *Η. pylori*, μεγέθους 1,65 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων DNA, κωδικοποιεί περίπου 1500 πρωτεΐνες (22) και βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς τροποποίησης κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης (23). Παρόλα αυτά, οι βακτηριακής προέλευσης παράγοντες παθογένειας που έχει διαπιστωθεί ότι εμπλέκονται στην κλινική εκδήλωση της *Η. pylori* λοίμωξης συνοψίζονται σε:

- i. Γονίδια τα οποία εκφράζονται σε ορισμένα μόνο στελέχη, όπως τα γονίδια που συγκροτούν το νησίδιο παθογένειας cag (cag Pathogenicity Island, cagPAI), συμπεριλαμβανόμενου του cagA (5), καθώς και ορισμένα γονίδια που εντοπίζονται στη μεταβλητή περιοχή του γενώματος (plasticity region) του *H. pylori*, όπως το dupA (duodenal ulcer-promoting gene), που έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη έλκους (24).
- ii. Γονίδια που εκφράζονται μεν σε όλα τα στελέχη αλλά παρουσιάζουν ποικιλία γονοτύπων, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη κυτταροτοξίνη VacA (25).
- iii. Γονίδια των οποίων η έκφραση τροποποιείται από το περιβάλλον και τις μεταβολικές απαιτήσεις του βακτηρίου, όπως τα *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babB*, *babC* και *hopZ*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του *H. pylori* απαραίτητες για την πρόσδεση του βακτηρίου στο γαστρικό επιθηλιακό κύτταρο (24).

1.1.3 Παθογένεια του *Η. pylori*

Η γαστρική λοίμωξη από *Η. pylori* είναι χρόνια, αποκτάται κατά κύριο λόγο νωρίς κατά την παιδική ηλικία προκαλώντας επιφανειακή ή και χρόνια ενεργό φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου (γαστρίτιδα) σε όλους τους φορείς και εμμένει εφ' όρου ζωής αν δεν αντιμετωπιστεί (26). Η αναπτυσσόμενη χρόνια γαστρίτιδα, αν και ασυμπτωματική στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (27),

εκδηλώνεται συνήθως ως μη ελκωτική (λειτουργική) δυσπεψία. Παρόλα αυτά, το 5% των παιδιών και στο 10-15% των ενηλίκων, η λοίμωξη ευθύνεται για την ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού ή γαστρικού έλκους (πεπτικό έλκος) (26). Αποκλειστικά κατά την ενήλικη ζωή, η χρόνια φλεγμονή μπορεί να μετεξελιχθεί στο 1% περίπου των ασθενών σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα μη καρδιακού τύπου και στο 0.5-1% σε εξωλεμφαδενικό μη-Hodgkin λέμφωμα από B-κύτταρα της οριακής ζώνης τύπου MALT (extranodal marginal zone lymphoma of Mucosal-Associated Lymphoid Tissue, MALT lymphoma) (26), ως επί το πλείστον σε άτομα μεγαλύτερα των 50 ετών (28) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Φυσική εξέλιξη της λοίμωξης από Η. pylori. (4)

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες, ο επιπολασμός της λοίμωξης βάσει ορολογικού προσδιορισμού των αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου, ανέρχεται κατά μέσο όρο στο 30-40% σε ανεπτυγμένες χώρες, ενώ ξεπερνά το 70% στον αναπτυσσόμενο κόσμο (29). Σε όλες τις ανεπτυγμένες χώρες μετά την ανακάλυψη του *Η. pylori* τη δεκαετία του 1980 (8), παρατηρείται σταδιακή ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης της λοίμωξης συγκριτικά με το παρελθόν (29) και μεγάλη διαφορά στον επιπολασμό μεταξύ παιδιών και ενηλίκων (30).

Η λοίμωξη αποκτάται νωρίς κατά τη παιδική ηλικία, πριν το πεμπτο έτος της ηλικιας (30), στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, ενώ σε παιδία μεταξύ 10-15 ετών η χρόνια λοίμωξη έχει πλέον εγκατασταθεί (31). Η

μετάδοση μπορεί να πραγματοποιείται από άνθρωπο σε άνθρωπο, κάθετα ή οριζόντια, μέσω της στοματικής οδού (στοματο-στοματικά, γαστρο-στοματικά ή κοπρανο-στοματικά), ενώ υπάρχουν ενδείξεις εισροής στελεχών στο περιβάλλον μέσω της τροφής ή και του πόσιμου ύδατος (19) και πιθανόν από οικόσιτα ζώα (32). Η οδός μετάδοσης του *Η. pylori* εξαρτάται κατά πολύ από την κοινωνικο-οικονομική κατάσταση του μελετώμενου πληθυσμού (33). Σε ανεπτυγμένες χώρες, οι οποίες εμφανίζουν αναλογικά χαμηλότερο επιπολασμό της λοίμωξης, η πλέον κλασική οδός απόκτησης του βακτηρίου είναι κάθετη, εντοπιζόμενη στον άμεσο οικογενειακό κύκλο του παιδιού, ειδικά τη μητέρα (34), λόγω της στενής επαφής που αναπτύσσεται μεταξύ τους. Σε αναπτυσσόμενες χώρες ή αγροτικές περιοχές με υψηλό επιπολασμό, όπως καταδεικνύεται από φυλογενετικές μελέτες (35) δεν παρατηρείται οικογενειακός φραγμός στην εισροή στελεχών, με αποτέλεσμα η μετάδοση να γίνεται οριζόντια (36) και να είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη.

Η λοίμωξη εκδηλώνεται στη συντριπτική πλειοψηφία των φορέων ως χρόνια επιφανειακή γενικευμένη γαστρίτιδα η οποία, ακόμη και στις περιπτώσεις που παραμένει ασυμπτωματική, προκαλεί ήπιας μορφής φλεγμονή ορατή σε βιοπτικό υλικό, η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και της εμμένουσας παρουσίας IL-8 στο γαστρικό βλεννογόνο (37). Η παρουσία της χρόνιας γαστρικής φλεγμονής καθώς και η ενεργοποίηση μεταγραφικών μονοπατιών όπως αυτή του NF-kB, αποτελούν καθοριστικά στοιχεία που συσχετίζουν την φλεγμονή με τη διαδικασία καρκινογένεσης. Έτσι, το *Η. pylori* αποτελεί μεν αιτολογικό παράγοντα ανάπτυξης πεπτικού έλκους, αλλά και ένα καθοριστικό (5,9 παράγοντα κινδύνου φορές) για την εμφάνιση γαστρικού αδενοκαρκινώματος και MALT λεμφώματος γαστρικού τύπου, συνήθως μετά το πεντηκοστό έτος της ηλικίας στο 1% περίπου των προσβεβλημένων ατόμων (26, 28) (Εικόνα 2). Ποικίλες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της μελέτης σε 1,526 Γιαπωνέζους ασθενείς (38), παρέχουν επαρκείς ενδείξεις ότι η H. pylori μόλυνση αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, καταδείχθηκε η πλήρη απουσία γαστρικού καρκίνου στην ομάδα ασθενών μετά από επιτυχή εκρίζωση (38), ενώ διαπιστώθηκε εμφάνιση γαστρικού καρκίνου σε περίπου 3% των ασθενών που παρέμειναν

φορείς της μόλυνσης. Εκρίζωση του *Η. pylori* μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου σε μολυσμένα άτομα χωρίς προκαρκινικές αλλοιώσεις. Τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι η εκρίζωση μείωσε σημαντικά την παρουσία προκαρκινικών αλλοιώσεων, παρέχοντας πρόσθετη απόδειξη ότι το *Η. pylori* επιδρά στα αρχικά στάδια της γαστρικής καρκινογένεσης (39, 40). Σε πειραματικές λοιμώξεις, σε γερβίλους Μογγολίας, η εκρίζωση του *Η. pylori* οδήγησε σε σημαντική μείωση της εξέλιξης προς γαστρικό καρκίνο (41, 42). Η παρουσία, λοιπόν, του Η. pylori είναι καθοριστική, καθώς η εκρίζωσή του οδηγεί τόσο σε επούλωση του δωδεκαδακτυλικού, όσο και του γαστρικού έλκους, αλλά και σε υποστροφή της συντριπτικής πλειοψηφίας των MALT λεμφωμάτων (περίπου 75%), εφόσον γίνει διάγνωση σε πρώιμο στάδιο (28).



Εικόνα 2: Κύριοι φαινότυποι κλινικής εκδήλωσης της Ελικοβακτηριακής λοίμωξης σύμφωνα με τους *Amieva και El-Omar*, 2008 (3).

1.2 Γαστρικός Καρκίνος

Σχεδόν ένα εκατομμύριο περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο, καθιστώντας τον ως την τέταρτη πιο κοινή μορφή καρκίνου παγκοσμίως. Αποτελεί δε τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με καρκίνο, καθώς περίπου 700.000 άνθρωποι ετησίως υποκύπτουν από αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (43). Σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα είναι η πιο συχνή κακοήθεια, συγκεκριμένα στην Ιαπωνία η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου είναι σχεδόν δέκα φορές υψηλότερη από τα ποσοστά που παρατηρούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες (44). Τυπικά, η διάγνωση του γαστρικού καρκίνου καθυστερεί λόγω της έλλειψης πρόωρων συμπτωμάτων και οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται μετά την εισβολή του καρκίνου στο μυϊκό χιτώνα. Αυτό μπορεί να αποτελεί την εξήγηση στο γεγονός ότι η 5-ετής επιβίωση ασθενών με καρκίνο του στομάχου στις Ηνωμένες Πολιτείες κυμαίνεται σε ποσοστά χαμηλότερα από 15% (44).

1.2.1 Τύποι γαστρικού καρκίνου

Ιστολογικά, έχουν ταυτοποιηθεί δύο διακριτές παραλλαγές γαστρικού καρκίνου αφενός του διάχυτου τύπου, ο οποίος συνίσταται από μεμονωμένα διηθητικά νεοπλασματικά κύτταρα που δεν σχηματίζουν αδενικές δομές και αφετέρου του εντερικού τύπου, ο οποίος αναπτύσσεται μέσα από μια σειρά καλά καθορισμένων ιστοπαθολογικών διαδικασιών και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975 (Εικόνα 3) (1). Το εντερικού τύπου αδενοκαρκίνωμα, αρχίζει με τη μετάπτωση του κανονικού βλεννογόνου σε κατάσταση χρόνιας επιφανειακής γαστρίτιδας, η οποία μεταπίπτει σε ατροφία των οξυντικών κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου και αντικατάσταση τους από επιθηλιακά κύτταρα εντερικού τύπου (εντερική μεταπλασία). Τα ως άνω στάδια θεωρούνται πρώϊμες προ-καρκινικές αλλοιώσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Αυτή η μορφή γαστρικού καρκίνου επηρεάζει τους άνδρες συνήθως σε διπλάσια συχνότητα από τις γυναίκες και εμφανίζεται σε άνδρες με μέσο όρο ηλικίας τα 50,4 χρόνια και σε γυναίκες με

μέσο όρο ηλικίας 47,7 χρόνια (45, 46). Τα άτομα που πάσχουν από πανγαστρίτιδα του σώματος του στομάχου έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, πράγμα που συνδέεται εν μέρει με μειωμένη έκκριση υδροχλωρικού οξέος. Αντιθέτως, τα άτομα τα οποία πάσχουν από λοίμωξη στο άντρο του στομάχου, όπως το δωδεκαδακτυλικό έλκος, όπου υπάρχει αυξημένη παραγωγή οξέος, φαίνεται να εμφανίζουν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (26).



Εικόνα 3: Πολυπαραγοντικό μονοπάτι που οδηγεί σε γαστρικό καρκίνωμα. Αναφέρονται βακτηριακοί, περιβαλλοντικοί, καθώς και παράγοντες του ξενιστή που συντελούν στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου (1).

1.3 Παράγοντες παθογένειας του Η. pylori

1.3.1 Vacuolating-cytotoxin A (VacA)

Η πρωτεΐνη VacA συντίθεται σαν ένα πρόδρομο μόριο το οποίο υφίσταται διάσπαση τόσο στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εκκρινόμενου μονομερούς. Τα μονομερή αυτά συνενώνονται προς σχηματισμό ενός ολιγομερούς συμπλέγματος με δομή εξαγώνου ή επταγώνου. Όταν το σύμπλεγμα αυτό εκτεθεί σε χαμηλό pH τα ολιγομερή της VacA αποσυντίθενται σε μονομερή με αποτέλεσμα την επαγωγή της καταστροφής των κυττάρων μέσω της δημιουργίας κενοτοπίων (47). Έχει αναφερθεί ότι η VacA προκαλεί ανοσολογική ρύθμιση μέσω της παρεμπόδισης της επεξεργασίας των αντιγονικών πεπτιδίων στα Β λεμφοκύτταρα και την έκθεσής τους στα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα (48). Επιπλέον, δύο ανεξάρτητες ομάδες κατέδειξαν ένα ρόλο της VacA στην ενεργοποίησης καταστολή της TOU πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων Τλεμφοκυττάρων (NFAT) (49).

Παρόλο που η πρωτεΐνη VacA συναντάται σε όλα τα κλινικά στελέχη *Η. pylori* μόνο το 50% αυτών προκαλεί κυτταρική καταστροφή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αλληλουχία της VacA διαφέρει μεταξύ στελεχών στην μεση (middle, m) την περιοχή σήματος (signal, s) και την ενδιάμεση περιοχή (intermediate, i) (Εικόνα 4). Όλες οι περιοχές απαντούν υπό τη μορφή ενεργών (s1, i1, d1, m1) ή ανενεργών αλληλιών (s1, i1, d1, m1), εώ για τα *vac*A s1 και m1 έχουν αναφερθεί 3 επιμέρους τύποι (a, b, c), οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένες συχνότητες σε συγκεκριμένες γεωγραφικές χώρες (7). Από τη μελέτη των διαφορετικών υποτύπων προκύπτει ότι ο πλέον τοξικός ο συνδυασμός s2m2, ενώ ο υπότυπος s2m1 δεν έχει παρατηρηθεί (47).

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί μια πιθανή συντονισμένη δράση των πρωτεϊνών VacA και CagA αν και ανήκουν σε διαφορετική περιοχή του γονιδιώματος του *H. pylori*. CagA-θετικά στελέχη εκφράζουν τους πλέον τοξικούς υποτύπους s1m1 ή s1m2 της VacA, ενώ CagA-αρνητικά στελέχη εκφράζουν συνήθως

τον ανενεργό υπότυπο s2m2 της VacA . Έτσι λοιπόν έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι η CagA προκαλεί λύση του γαστρικού επιθηλίου, ενώ η VacA περνά στο χόριο και προκαλεί ανοσολογική ρύθμιση ώστε να εγκατασταθεί χρόνια λοίμωξη [39]. Παρόλα αυτά, τα αλλήλια της περιοχής i, η οποία κωδικοποιεί τμήμα της p33 περιοχής, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα φαίνεται να αποτελούν τον παράγοντα που καθορίζει το αν η ώριμη πρωτεΐνη θα είναι ή όχι κυτταροτοξική *in vitro*, ειδικά στην περίπτωση στελεχών με το συνδυασμό αλληλίων s1/m2, στα οποία η VacA είναι λειτουργική σε



Εικόνα 4: Γράφημα δομής της VacA. Αριστερά η δομική αλλαγή της VacA από τη σύνθεσή της έως την έκκριση. Δεξιά οι διάφοροι δομικοί συνδυασμοί των υπότυπων s, m και i (7)

1.3.2 Μόρια Προσκόλλησης και Εξωτερικές Μεμβρανικές Πρωτεΐνες (OMPs).

Η προσκόλληση του *Η. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, καθιστά πιο εύκολο τον αποικισμό του βακτηρίου, αυξάνει την εμμονή της λοίμωξης και τη δυνατότητα μεταφοράς των λοιμογόνων παραγόντων στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Ανάλυση της αλληλουχίας έξι πλήρως αλληλουχημένων στελεχών του *Η. pylori* αποκαλύπτει ότι περίπου το 4% του γονιδιώματος του



Εικόνα 5: Αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου *Η. pylori* και των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Μόρια προσκόλλησης όπως η BabA, SabA και OipA μεσολαβούν στη σύνδεση του *Η. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, μέσω πιθανόν της άνω επιφάνειας (7).

H.pylori κωδικοποιεί εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες (OMPs), οι οποίες είναι σημαντικά περισσότερες από ότι για άλλα γνωστά βακτηριακά είδη. Η έκφραση των OMPs έχει συσχετιστεί με γαστροδωδεκαδακτυλικές ασθένειες και επιπλέον μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη γαστρικού

καρκίνου (50). Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικότερα μερικά από τα μόρια προσκόλλησης και κάποιες OMPs.

BabA. Ομάδα αντιγόνων του αίματος σύνδεσης της συγκολητίνης (BabA), τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια *babA*² και δεσμεύονται με τα φουκοσυλιωμένα *Lewis^b* αντιγόνα (Le^b) στην επιφάνεια των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 4). Η παρουσία του *babA*² γονιδίου έχει συσχετισθεί με ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού έλκους και γαστρικού καρκίνου, ενώ όταν βρίσκεται σε συνδυασμό με τα CagA και VacA s1 αλληλόμορφα, σχετίζεται με ακόμη πιο σοβαρές ασθένειες (51).

SabA, **OipA**. Η συγκολλητίνη που είναι συνδεδεμένη με σιαλικό οξύ (SabA) (Εικόνα 5) είναι μια συγκολλητίνη του *H.pylori* που συνδέεται σχηματίζοντας δομή υδατάνθρακα σιαλυλ-*Lewis^x* αντιγόνου, το οποίο εκφράζεται στο γαστρικό επιθήλιο και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης δωδεκαδακτυλικού έλκους (52). Η έκφραση των σιαλυλ-*Lewis^x* αντιγόνων επάγεται κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής του στομάχου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *H. pylori* διαμορφώνει γλυκοζυλιωμένα μοτίβα των αντιγόνων του κυττάρου ξενιστή, έτσι ώστε να ενισχύσει την ικανότητα πρόσδεσης αλλά και τον εποικισμό του σε αυτόν (53). Πειραματική λοίμωξη, in vitro, με *H. pylori* επάγει την έκφραση των σιαλυλ-*Lewis^x* αντιγόνων μέσω επαγωγής του γονιδίου που κωδικοποιεί τη beta3 GlcNac T5, μια τρανσφεράση απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των αντιγόνων Lewis (54).

Η εξωτερική φλεγμονώδης πρωτεΐνη (OipA) (Εικόνα 5) είναι μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που σχετίζεται με φλεγμονή (55). Το *Η. pylori* περιέχει είτε ένα λειτουργικό είτε ένα μη λειτουργικό γονίδιο οipA και η παρουσία ενός λειτουργικού γονιδίου σχετίζεται σημαντικά aμ тην παρουσία δωδεκαδακτυλικού έλκους, γαστρικού καρκίνου και αυξημένη διήθηση ουδετερόφιλων (52, 56). Η έκφραση της πρωτεΐνης OipA συνδέεται με αύξηση των επιπέδων παραγωγής της ιντερλευκίνης IL-8 in vitro (57). Η OipA πρωτεΐνη συμμετέχει επίσης απορρύθμιση της στην μεταλλοπρωτεϊνάσης 1 (ΜΜΡ-1), μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στον γαστρικό καρκίνο (58).

DupA. Το γονίδιο που προάγει δωδεκαδακτυλικό έλκος (DupA) βρίσκεται εντός της μη συντηρημένης περιοχής του γονιδιώματος του *H. pylori* και

33

μπορεί να θεωρηθεί ως άλλος ένας δείκτης παθογένειας. Η αρχική ανάλυση 500 στελεχών του *Η. pylori* από την Κολομβία, τη Νότια Κορέα και την Ιαπωνία έδειξε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης δωδεκαδακτυλικού έλκους και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου σε άτομα που φέρουν dupA-θετικά στελέχη (59). Σε *in vitro* πειραματική μόλυνση, η πρωτεΐνη DupA αυξάνει την παραγωγή της IL-8 (59).

FlaA. Το *H.pylori* έχει μια μονοπολική δεσμίδα από 3 έως 5 μαστίγια, τα οποία αποτελούνται από τρία δομικά συστατικά: το βασικό σώμα, το άγκιστρο, και το νήμα (60, 61). Το νήμα λειτουργεί ως έλικα όταν περιστρέφεται στη βάση του και είναι συμπολυμερές με τις υπομονάδες της μαστιγίνης FlaA και FlaB (62, 63). Η FlaA είναι η κυρίαρχη υπομονάδα και η FlaB είναι η δευτερεύουσα υπομονάδα. Μετάλλαξη στο γονίδιο flaA έχει ως αποτελέσματα την αποκοπή των μαστιγίων και τη μείωση της κινητικότητας του βακτηρίου in vitro (64). Σε πειράματα in vivo, η FlaA και άλλες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τη συγκρότηση των μαστιγίων και για την επιμονή της λοίμωξης σε τρωκτικά και αξενικά μοντέλα χοιριδίων (62, 65, 66).

1.3.3 Νησίδιο παθογένειας cag (cagPAI)

Το *H. pylori* εμφανίζει εξαιρετική ποικιλομορφία στο γονιδίωμά του και επάγει παράγοντες παθογένειας οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της μόλυνσης. Το νησίδιο παθογένειας cag (cag Pathogenicity Island, *cag*PAI), είναι ένα τμήμα DNA 40000bp (base pairs – ζεύγη βάσεων) που κωδικοποιεί 27-31 γονίδια, τα οποία πλαισιώνονται από μια περιοχή 31bp. Η κυτταροτοξίνη CagA (Cytokine-Associated gene-A) (5, 45), μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες του *H. pylori*, κωδικοποιείται από το νησίδιο παθογένεισς του *Η. pylori*, κωδικοποιείται από το νησίδιο παθογένεισς τημημα DNA 4000 με την εξαιρετική της με την εμφάνιση πεπτικού έλκους (25). Λόγω της συσχέτισης της με την κλινική νόσο, η πρωτεΐνη CagA χρησιμοποιείται συχνά ως μάρτυρας για την παρουσία του συνολικού cagPAI, ενώ το cagPAI χαρακτηρίζεται συνολικά σαν παράγοντας παθογένειας του *Η. pylori* (1).

Περίπου 60-70% των στελεχών *Η. pylori* που απομονώνονται στις Δυτικές κοινωνίες και σχεδόν το 100% των στελεχών στην Ανατολική Ασία εκφράζουν την πρωτεΐνη CagA (45, 47). Αν και όλα τα στελέχη του *Η. pylori* επάγουν

γαστρίτιδα, τα στελέχη τα οποία κωδικοποιούν το cagPAI (cag+) αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης βαρύτερων μορφών γαστρίτιδας, καθώς και ατροφικής γαστρίτιδας και εντερικής μεταπλασίας, σε σύγκριση με στελέχη που δεν κωδικοποιούν το cagPAI (67). Τουλάχιστον 18 γονίδια cag κωδικοποιούν συστατικά του τύπου IV εκκριτικού συστήματος μεταφοράς (T4SS), του οποίου μέχρι τώρα η κύρια λειτουργία είναι η μεταφορά της βακτηριακής πρωτεΐνης CagA μέσα στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Εικόνα 6) (10)



Εικόνα 6: Υποθετικό μοριακό μοντέλο του τύπου ΙV εκκριτικού συστήματος του CagPAI βασισμένο στο αντίστοιχο μοντέλο του μύκητα *A. tumefaciens* και σε φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (6).
1.3.4 Παράγοντας Παθογένειας CagA

Τα στελέχη του *Η. pylori* διακρίνονται σε CagA-θετικά και CagA-αρνητικά, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία του γονιδίου cagA. Τα CagA-θετικά στελέχη έχουν συνδεθεί με μεγαλύτερης βαρύτητας περιστατικά χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας και καρκινογένεσης. Ασθενείς οι οποίοι μολύνονται με CagA-θετικά στελέχη επάγουν την έκκριση διαφόρων κυτοκινών και προκαλούν μεγαλύτερης βαρύτητας αλλοιώσεις στο γαστρικό βλεννογόνο (68). Η πρωτεΐνη CagA του H. pylori είναι μια πρωτεΐνη 120-140kDa που μεταφέρεται, μετά από βακτηριακή προσκόλληση, εντός των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μέσω του T4SS. Το σύστημα αυτό παρουσιάζει αναλογία με το εκκριτικό σύστημα που έχει περιγραφεί για το A. tumefaciens το οποίο όμως είναι υπεύθυνο για μεταφορά DNA (69) και όχι πρωτεϊνών. Αντίθετα μέχρι σήμερα, μόνο η πρωτεΐνη CagA έχει δειχθεί ότι μεταφέρεται από το T4SS με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP (69).Επιπλέον, το T4SS μεταφέρει και πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος του H. pylori οι οποίες μετά από αναγνώριση τους από το ενδοκυττάριο σύστημα των Nod πρωτεϊνών, επάγουν μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, την έκκριση χημειοτακτικών παραγόντων, όπως της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (67).

Η πρωτεΐνη CagA μετά την είσοδο της εντός των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης (Υ) που μετέχουν σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα *Γλουταμινικού οξέος – Προλίνης – Ισολευκίνης – Τυροσίνης - Αλανίνης* (EPIYA), από κινάσες του κυττάρου ξενιστή (70). Αυτή η φωσφορυλίωση, έχει δειχθεί ότι επάγει σε πειραματικά μοντέλα *in vitro* μόλυνσης γαστρικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών (AGS), ένα φαινότυπο επιμήκυνσης και διασποράς (70-73), γνωστό και ως hummingbird. Η φωσφορυλίωση της CagA αποτελεί αναγκαία και ικανή συνθήκη για τον φαινότυπο διασποράς (70).

Ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές αυξητικού τύπου με χαλάρωση των κυτταρικών στενοσυνδέσμων, παρουσία ελασματοποδίων (λεπτών φύλλων ακτίνης στη άκρη του κυττάρου) και φιλοποδίων (ακίδων που περιέχουν σφιχτή δέσμη των ινών ακτίνης) (74) και αυξημένη κινητικότητα που παραπέμπει σε μεταστατικό φαινότυπο (Εικόνα 7). Ο ραμφοειδής φαινότυπος που εμφανίζεται κατά την *in vitro* επιμόλυνση AGS κυττάρων, προσομοιάζει με εκείνον που διαμορφώνεται στον δυσπλαστικό ιστό ως πρόδρομος του αδενοκαρκίνωματος (75).



Εικόνα 7: Μορφολογικές αλλαγές των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της in vitro μόλυνσης τους από το *Η. pylori*. οι οποίες εξαρτώνται από το χρόνο αλλά και το στέλεχος του βακτηρίου.

Στα κλινικά στελέχη που απομονώνονται, έχουν αναγνωριστεί τέσσερις διαφορετικοί τύποι επαναλαμβανόμενων μοτίβων ΕΡΙΥΑ, ανάλογα με την πεπτιδ<u>ι</u>κή αλληλουχία που ακολουθεί και εντοπίζονται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CagA (Εικόνα 8). Αυτά είναι τα *ΕΡΙΥΑ-Α*: <u>ΕΡΙΥΑ</u>ΚVNKKKTGQVASPE, *ΕΡΙΥΑ-Β*: <u>ΕΡΙΥΑ</u>QVAKKVNAKIDRLNQAASG και *ΕΡΙΥΑ-C*: <u>ΕΡΙΥΑ</u>TIDDLGGP. Ειδικά σε στελέχη απομονωμένα από Ασιατικούς πληθυσμούς αντί των επαναλήψεων ΕΡΙΥΑ-C παρατηρείται μία μοναδική αλληλουχία *ΕΡΙΥΑ-D*: <u>ΕΡΙΥΑ</u>ΤΙDFDEAN (Εικόνα 8). Οι τύποι αυτοί παρουσιάζουν διαφορετική γεωγραφική κατανομή. Έτσι στα δυτικού τύπου στελέχη όπως αυτά από Ευρώπη, Βόρεια Αμερική και Αυστραλία περιέχουν στην πλειοψηφία τους μοτίβα τύπου ABC και ABCC αλλά όχι μοτίβα κατηγορίας D τα οποία απαντώνται μόνο στα στελέχη από την Ανατολική Ασία (45).



Εικόνα 8: Δομή της πρωτέινης CagA (45).

Με την είσοδο της στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων η CagA φωσφορυλιώνεται ιεραρχικά από κινάσες της οικογένειας Src (Εικόνα 9), στο κατάλοιπο τυροσίνης των ΕΡΙΥΑ-C μοτίβων και σε μεταγενέστερους χρόνους από την κινάση Abl στα μοτίβα EPIYA-A και EPIYA-B (76). Μέσω των φωσφορυλιωμένων μοτίβων ΕΡΙΥΑ η CagA αλληλεπιδρά με μια σειρά από πρωτεΐνες του κυττάρου που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor -HGF). Αυτές είναι η SHP-2 φωσφατάση (Src homology SH2containing protein tyrosine phosphatase-2) (77), n Grb2 (Growth factor receptor bound-2) (78), η Csk (Carboxyl-terminal Src kinase) (79) και ο υποδοχέας του HGF (receptor/cMet) (80) (Εικ. 9). Επιπλέον αλληλεπιδράσεις έχουν αναφέρθεί και για αλλους παράγοντες όπως η φωσφατάση τυροσίνης η Grb7, η Crk, η PI3K (phosphoinositide-3-kinase), η RasGAP Shp1, (GTPάση της Ras), καθώς και οι κινάσες τυροσίνης Csk, Src και Abl (5). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορυλιωμένων μορφών της CagA (CagA^{PY}) και των πρωτεϊνών που περιέχουν SH2-περιοχές αλληλεπίδρασης επάγουν κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, όπως το φαινότυπο διασποράς και επιμήκυνσης (Εικόνα 10Α) (5). Αυτές οι κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις φαίνεται επάγονται ÓΤΙ μετά από ενεργοποίηση του Rap1→bRaf→MEK→Erk σηματοδοτικού μονοπατιού και την αποφωσφορυλίωση της κινάσης FAK (focal adhesion kinase)(81). Επιπλέον, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη CagA, μπορεί να επηρεάζει μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης του NF-κB, την περαιτέρω επαγωγή άλλων γονιδίων όπως της IL-8, των οποίων η ενεργοποίηση φαίνεται ότι εξαρτάται

38



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της διαδοχικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA και του επαγώμενου σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί σε κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις των μολυσμένων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (76).

από την ύπαρξη λειτουργικών θέσεων ΕΡΙΥΑ-C επαναλήψεων στη πρωτεΐνη CagA (5, 37).

Ακόμη και όταν η CagA, δεν φωσφορυλιώνεται στις ΕΡΙΥΑ θέσεις, ασκεί επιπτώσεις στο εσωτερικό του κυττάρου που συμβάλλουν στην παθογένεια (82). Ενδοκυττάρια μεταφορά, αλλά όχι φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA οδηγεί σε λύση των διακυτταρικών συνδέσμων της ε-καντχερίνης με ταυτόχρονη μη-φυσιολογική ενεργοποίηση β-κατενίνης (81), της διαταράσσοντας έτσι τους κορυφαίους συνδέσμους μεταξύ των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και προκαλώντας την απώλεια της κυτταρικής πολικότητας (7) (Εικόνα 10B). Η πρωτεΐνη CagA μπορεί να απορυθμίζει τους διακυτταρικούς συνδέσμους μέσω ποικίλλων μονοπατιών (82). Η εκκρινόμενη CagA έχει δειχθεί ότι εντοπίζεται στους επιθηλιακούς στενοσυνδέσμους των πρωτεϊνικών ικριωμάτων, σε σχέση με τις πρωτεΐνες ZO-1 (zona occludens-1)

διαμεμβρανική πρωτεΐνη JAM (junctional adhesion molecule), και προκαλώντας τον έκτοπο σχηματισμό του συμπλόκου των κορυφαίων συνδέσμων και εκτοπίζοντας τα συστατικά των στενοσυνδέσμων σε θέσεις βακτηριακής προσκόλλησης (3). Συνολικά, η μη-φωσφορυλιωμένη CagA έχει δειχθεί επίσης ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με ένα αριθμό άλλων ενδοκυττάριων παραγόντων όπως тην πρωτεΐνη διακυτταρικής προσκόλλησης ε-καντχερίνη (81), τον υποδοχέα HGF receptor/cMet, τη PLCγ (phospholipase-C-γ), τη Grb2 (Growth factor receptor bound) και την κινάση PAR1b/Mark2 (Kinase Partinioning-defective 1b/Mictotubule affinity-regulating kinase 2) (Εικόνα 10Β) (5). Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων αποτελεί η ενεργοποίηση προφλεγμονωδών και μιτογόνων αποκρίσεων, η διαταραχή των διακυτταρικών συνδέσμων και η απώλεια της κυτταρικής πολικότητας των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (7).



Εικόνα 10: Ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, Α) εξαρτώμενα από τη CagA^{PY} και B) ανεξάρτητα από τη CagA^{PY} (5)

1.4 Οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες (ΜΜΡ)

μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας Oı (Matrix Metalloproteinases-MMP) αποτελούν πολυμελή οικογένεια μια ενδοπεπτιδασών και εξωπεπτιδασών με κοινή δράση την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Οι ΜΜΡ παράγονται από μια ποικιλία κυττάρων, όπως λευκοκύτταρα (κυρίως πολυμορφοπύρηνα), αλλά και μακροφάγα των ιστών, ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και αστροκύτταρα. Τα ένζυμα αυτά φαίνεται ότι παίζουν καταλυτικό ρόλο σε μια ποικιλία φυσιολογικών καταστάσεων, όπως στην αναδιαμόρφωση των ιστών, την απόπτωση, την εμβρυογένεση και την επούλωση τραυμάτων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η δράση των μεταλλοπρωτεϊνασών ελέγχεται από τους λεγόμενους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνασών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-TIMPs). Απώλεια ρύθμισης των μεταλλοπρωτεϊνασών έχει συνδεθεί με σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, η αρθρίτιδα, η αγγειογένεση, η καρκινογένεση και η μετάσταση νεοπλασματικών κυττάρων (83).

1.4.1 Η εξωκυττάρια ύλη

Η εξωκυττάρια ύλη (extracellular matrix-ECM), αποτελείται κυρίως από πρωτεογλυκάνες και μάλιστα της οικογένειας των λαμινινών, ενώ κολλαγόνα διαφόρων τύπων, περλεκάνη και αγρίνη συμμετέχουν σε μικρότερο ποσοστό (84, 85). Οι λειτουργίες της εξωκυττάριας ύλης συνίσταται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (86), στον κυτταρικό θάνατο (87), καθώς και την υποβοήθηση της αύξησης και ωρίμανσης των νευραξόνων (88). Σε γενικές γραμμές, τα μακρομόρια της εξωκυττάριας ύλης είναι σημαντικά για τη δημιουργία και τη διατήρηση ενός κυτταρικού περιβάλλοντος που προωθεί την ανάπτυξη του κυττάρων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ομοιόσταση του οργανισμού (89).

1.4.2 Κριτήρια ένταξης στην οικογένεια των Μεταλλοπρωτεϊνασών

Η δομή των ΜΜΡ κάθε κατηγορίας αποτελείται από διακριτά μορφολογικά τμήματα, τα οποία είναι με ελάχιστες εξαιρέσεις, κοινά για όλα τα μέλη της κατηγορίας (Εικόνα 11) (90). Τα διακριτά τμήματα είναι:

- i. "Προ-περιοχή" (Pre-domain): Ανάρρους (upstream) περιοχή της κυρίως πρωτεΐνης που μετέχει στην ρύθμιση της έκκριση της πρωτεϊνάσης από το κύτταρο.
- ii. Πρόδρομη περιοχή (Pro-domain): Περιοχή του άμινο-τελικού άκρου της πρωτεϊνάσης, μήκους περίπου 80-90 αμινοξέων, με αυτο-ανασταλτικό ρόλο όταν συνδέεται με το άτομο ψευδαργύρου (Zn) της καταλυτικής περιοχής που είναι υπεύθυνο για τη δράση του ενζύμου. Όταν το συγκεκριμένο πεπτίδιο αποκοπεί, τότε το ένζυμο ενεργοποιείται.
- iii. Καταλυτική περιοχή (Catalytic domain): Καταλυτική περιοχή η οποία περιέχει ένα άτομο Zn απαραίτητο για την καταλυτική δράση και ένα άτομο Zn για τη διατήρηση μιας σταθερής και λειτουργικής διαμόρφωσης. Η θέση της καταλυτικής περιοχής διαφέρει μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας, γεγονός που εξηγεί και τις διαφορές στα υποστρώματα.
- iv. Περιοχή ομοιάζον με αιμοπηξίνη (Hemopexin-like domain): Περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεϊνάσης που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση με το υπόστρωμα και την αλληλεπίδραση με τους αναστολείς TIMPs.
- ν. Διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane domain): περιοχή χαρακτηριστική
 των μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεϊνασών απαραίτητη για την σύνδεση
 ενός συγκεκριμένου τμήματος της MMP με την κυτταρική μεμβράνη.
- νἰ. "Διακόπτης κυστεΐνης" (Cysteine switch): Κατάλοιπο κυστεΐνης στο πρόδρομο πεδίο, με δυνατότητα σύνδεσης με το Zn του καταλυτικού κέντρου καθιστώντας το ένζυμο ανενεργό.
- vii. Κυτταροπλασματική «ουρά» (Cytoplasmic tail): περιοχή μήκους 25 αμινοξέων που χρησιμοποιείται για τη σύνδεση του ενζύμου στην αντίστοιχη περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης (για τις μεμβρανικές μεταλλοπρωτεϊνάσες).



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση μεταλλοπρωτεϊνασών. Pro-domain: Πρόδρομη περιοχή. Catalytic domain: Καταλυτική περιοχή. Henopexinlike domain: Περιοχή ομοιάζον με αιμοπηξίνη. Transmembrane domain: Διαμεμβρανική περιοχή. Gelatin binding domain: Περιοχή σύνδεσης με τη ζελατίνη Proline-rich O-glycosylated domain. (2)

1.4.3 Ταξινόμηση των Μεταλλοπρωτεϊνασών

Στον άνθρωπο έχουν μέχρι τώρα αναγνωριστεί τουλάχιστον 28 μέλη που απαρτίζουν την οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνασών (89). Με βάση τη φύση του ενζυματικού τους υποστρώματος, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες διαχωρίζονται σε κολλαγονάσες, ζελατινάσες, στρωμελυσίνες, μεμβρανικού τύπου και ματριλυσίνες, ενώ υπάρχουν και κάποιες οι οποίες δεν έχουν ενταχθεί σε κάποια συγκεκριμένη κατηγορία (Πίνακας 1) (84, 85).Το γεγονός ότι μια μεταλλοπρωτεϊνάση έχει ενταχθεί σε μια κατηγορία δε σημαίνει ότι αποδομεί αποκλειστικά ένα και μόνο υπόστρωμα. Αντίθετα, κάθε ένα μέλος της συγκεκριμένης οικογένειας μπορεί να διασπά πολλαπλά υποστρώματα.

Ομάδα	Μέλη	Υπόστρωμα	Ειδικά
Κολλαγονάσες	MMP-1, MMP-8 MMP-13, MMP-18	Κολλαγόνο (Ι, ΙΙ, ΙΙΙ, VII,VIII,X), ζελατίνη, σελεκτίνη, βερσικάνη, ΜΜΡ-2, 9	Οι κολλαγονάσες καθιστούν τα δομικά κολλαγόνα της θεμέλιας ουσίας επιδεκτικά σε αποδόμηση από τις υπόλοιπες MMP.
Ζελατινάσες	MMP-2, MMP-9	Ζελατίνη, κολλαγόνο Κολλαγόνο (Ι, ΙΙ, ΙΙΙ, ΙV, V, VΙΙ, ΧΙ, ΧΙV), ελαστίνη, φιμπρονεκτίνη, βερσικάνη, ΜΜΡ-1, -9, -13	Σε αντίθεση με τις κολλαγονάσες αποδομούν μετουσιωμένα κολλαγόνα (ζελατίνες) και άλλα μη ινικά κολλαγόνα καθώς και τη βασική μεμβράνη.
Στρωμελυσίνες	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Κολλαγόνο (ΙΙΙ, ΙV, V, IX), φιμπρονεκτίνη, ζελατίνη, ελαστίνη, σύμπλεγμα MMP-2/TIMP-2, MMP-7, -8, -9, -13, λαμινίνη	
Μεμβρανικού Τύπου (membrane type MMP ή MT-MMP)	MMP-14 έως MMP-17, MMP-24, MMP-25	Κολλαγόνα (Ι, ΙΙ, ΙΙΙ), ζελατίνες, άλλες ΜΜΡ	Μη διαλυτές ΜΜΡ με κοινό χαρακτηριστικό τη σύνδεσή με την κυτταρική μεμβράνη
Ματριλυσίνες	MMP-7, MMP-26	Αποδομούν ένα μεγάλο αριθμό συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.	Χαρακτηρίζονται από έλλειψη του πεδίου ομοιάζοντος με αιμοπηξίνη.
Λοιπές ΜΜΡ	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-26 MMP 27, MMP- 28	Αποδομούν ποικίλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας.	Δεν είναι ενταγμένες σε κάποια ομάδα MMP.

Πίνακας 1. Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνασών: οι επιμέρους ομάδες, τα μέλη, τα υποστρώματα και τα ειδικά χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας

1.4.4 Ρύθμιση της έκφρασης των Μεταλλοπρωτεϊνασών

Οι ΜΜΡ και οι αναστολείς τους, με εξαίρεση την ΜΜΡ-2 και τον TIMP-1, δεν εκφράζονται συνεχώς υπό φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο (84). Η παραγωγή των ΜΜΡ προάγεται ως απόκριση σε εξωγενή ερεθίσματα, όπως κυτταροκίνες, μιτογόνα, υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων, καθώς και μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ύλης (84). Η ρύθμιση της έκφρασης των ΜΜΡ είναι πολύπλοκη διαδικασία, η οποία γίνεται σε τρία επίπεδα: κατά τη διάρκεια της μεταγραφής (μεταγραφική) (85), μετά τη μεταγραφή (μετα-μεταγραφική) καθώς και μετά την έκκρισή τους από τους φυσικούς αναστολείς τους (91).

Κατά τη μεταγραφική διαδικασία ρύθμισης, συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες (c-Fos, C-Jun, AP-1) επάγουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κολλαγενάσες και τις στρωμελυσίνες (92, 93). Η διαδικασία παραγωγής των MMP ξεκινά με την ενεργοποίηση ενός αριθμού μηχανισμών σηματοδότησης που προάγονται από παράγοντες όπως οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1β, Tumor Necrosis Factor-α/TNF-α). Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-kB συμβάλει στην προαγωγή της ιντερλευκίνης IL-1, η οποία με τη σειρά της προάγει την έκφραση της ΜΜΡ-1. Στον αντίποδα, σε μεταγενέστερο στάδιο μεταμεταγραφικό στάδιο, η έκφραση των MMP είναι δυνατό να περιορίζεται από τη δράση των IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β (84), ενώ αναστέλλεται από τους TNF-α, IL-1, TGF-β (85). Τέλος, η υπεριώδης ακτινοβολία φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των MMP-1, MMP-3, και MMP-9 μέσω της ενεργοποίησης ειδικών πρωτεϊνικών κινασών της οικογένειας JNK-2 (94). Τα τελευταία χρόνια ο TGF-β έχει γίνει αντικείμενο ευρύτατης μελέτης, μια και φαίνεται ότι έχει διττό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των ΜΜΡ. Αφενός αναστέλλει τη δράση τους και πιο συγκεκριμένα των κολλαγονασών και των στρωμελυσινών, αποτρέποντας ντας με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της μεσοκυττάριας ουσίας, και αφετέρου προάγει την έκφραση του TIMP-1 (84). Τέλος, η ρύθμιση της δράσης των ΜΜΡ γίνεται και από τους φυσικούς αναστολείς τους (Tissue Inhibitors of Mettaloproteinases- TIMPs) (95). Η απώλεια ισορροπίας προς όφελος της ενεργοποίησης ΜΜΡ έχει σαν

45

αποτέλεσμα την ανώμαλη δράση τους σε έναν μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων. Οι ενδογενείς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνασών είναι μικρά μόρια (22-30 kDa) (96) τα οποία ανιχνεύονται στους περισσότερους ιστούς και βιολογικά υγρά. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ισομορφές στον άνθρωπο: TIMP-1, -2, -3, -4 (84, 97-99). Αναστέλλουν όλες τις MMP με την εξαίρεση του TIMP-1 που δεν μπορεί να αναστείλει την MMP-14 (100).

1.4.5 Η ενεργοποίηση των Μεταλλοπρωτεϊνασών

Οι ΜΜΡ μπορούν να ενεργοποιηθούν αφενός in vivo από την ενεργοποίηση πρωτεϊνασών και in vitro από χημικές ουσίες όπως το APMA (4aminophenylmer-curic acetate), o $\delta_{1\chi}\lambda\omega\rho_{1}$ ούχος υδράργυρος (HgCl₂), το SDS (sodium dodecylsulfate) (101). Το χαμηλό pH και η θερμοκρασία αποτελούν παράγοντες ενεργοποίησης των ΜΜΡ (102). Η ενεργοποίηση προυποθέτει τη διάσπαση της ανενεργού πρόδρομης μορφής τους (90). Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα για τις περισσότερες ΜΜΡ του εξωκυττάριου χώρου, με την εξαίρεση τη ΜΜΡ-11 και των ΜΜΡ-μεμβρανικού τύπου οι οποίες ενεργοποιούνται πριν από την έκκρισή τους. Κατά κανόνα, οι ενεργές μορφές είναι περισσότερο ασταθείς από τις πρόδρομες, και συνήθως οι ΜΜΡ και κυριότερα αυτές του μεμβρανικού τύπου, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση άλλων μελών της οικογένειάς τους (102). Παράλληλα με την εξωκυττάρια ενεργοποίηση, παρατηρείται και ενεργοποίηση στην κυτταρική επιφάνεια. Έτσι για παράδειγμα, η MMP-3 ενεργοποιεί την proMMP-9 και το σύμπλεγμα proMMP-9/TIMP-1 σε συνδυασμό με την MMP-3 ενεργοποιεί την MMP-9 (103). Επιπλέον, η MT1-MMP ενεργοποεί την MMP-13 και η MMP-2 ενισχύει την παραπάνω ενεργοποίηση. Η ΜΤ1-ΜΜΡ, επίσης ενεργοποιεί την MMP-2, η MMP-10 την proMMP-8, ενώ η MMP-3 φαίνεται να διασπά τις πρόδρομες μορφές των ΜΜΡ-1, -7, -9 και -13 (102). Η ενεργοποιημένη ΜΜΡ-7 μπορεί να ενεργοποιήσει τόσο την MMP-1 όσο και την MMP-9 (102). Από τα προαναφερθέντα παραδείγματα καταδεικνύεται η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις ΜΜΡ η οποία εντοπίζεται ανάμεσα στη σύνθεση και την ενεργοποίηση τους. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των MMP και των TIMPs έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την ομοιόσταση των ιστών.

1.4.6 Η λειτουργία των Μεταλλοπρωτεϊνασών

Οι ΜΜΡ εμπλέκονται σε μία πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων (90). Γενικά παίζουν ρόλο στην αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης και του συνδετικού ιστού, στη σύσπαση των μυών εξαιτίας της βλάβης, στην αγγειογένεση, στην αύξηση του μεγέθους των νεοπλασιών και πιθανώς στη διαδικασία μετάστασή τους. Η δράση των ΜΜΡ αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στην παθογένεια πληθώρας ασθενειών όπως αθηροσκλήρωση, αρθρίτιδα, καρδιακή ανεπάρκεια, καρκίνος, οζώδης σκλήρυνση κ.λπ.

επίπεδο, MMP Σε κυτταρικό ŋ δράση των χαρακτηρίζεται από αλληλεπικαλυπτόμενα υποστρώματα, ενώ θεωρείται πιθανό η δράση πολλών από αυτές να αντισταθμίζει την απώλεια ή τη μη παραγωγή ενός άλλου μέλους της οικογένειας (102, 104, 105). Με αυτό το τρόπο, αποτρέπεται η εναπόθεση περίσσειας θεμέλιας ουσίας. Η αυξημένη παραγωγή ΜΜΡ μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αποδόμηση σε πρώτο στάδιο αλλά και αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση της θεμέλιας ουσίας μεταγενέστερα. Οι παραπάνω δράσεις σε συνδυασμό με αυτή των αναστολέων τους είναι ενδεικτικές του σημαντικού ρόλου που παίζουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στη διατήρηση της ομοιόστασης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επιπλέον, ως ένζυμα με πρωτεολυτικές ιδιότητες συμμετέχουν στην αποδόμηση άλλων πρωτεϊνασών, κυτταροκινών και πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας (102, 104, 105).

1.4.7 Στρωμελυσίνη 1 ή Μεταλλοπρωτεϊνάση 3 (ΜΜΡ-3)

Το όνομα στρωμελυσίνη υποδηλώνει ότι η μεταλλοπρωτεϊνάση που υδρολύει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία προέρχεται από κύτταρα του στρώματος (106). Η ενζυμική δραστικότητα της MMP-3 αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1974 (107) ως μια μεταλλοπρωτεϊνάση η οποία αποδομεί τις πρωτεογλυκάνες των χόνδρων και από μια ουδέτερη πρωτεϊνάση των ινοβλαστών του κουνελιού (108). Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου, από καλλιέργεια κυττάρων των οστών κουνελιού και ονομάστηκε πρωτεογλυκανάση (109) και αργότερα μετονομάστηκε σε στρωμελυσίνη (110). Αργότερα, το ένζυμο καθαρίστηκε και απομονώθηκε από καλλιέργειες ινοβλαστών του αρθρικού υμένα, που προέρχονταν από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και για να ξεχωρίζει από την ενδιάμεση κολλαγενάση (MMP-1) και τη ζελατινάση Α (MMP-2), ονομάστηκε MMP-3 από τον Okada και συν. (111).

Η MMP-3 εμφανίζει εξαιρετική ομολογία με άλλες MMP. Η ανθρώπινη prepro-MMP-3 περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (17 αμινοξέων), ένα προπεπτίδιο (82 αμινοξέων) μία καταλυτική περιοχή (165 αμινοξέων), ένα "διακόπτη κυστεΐνης" πλούσιο σε προλίνες (25 αμινοξέων) και μια καρβόξυ-τελική περιοχή (188 αμινοξέων), η οποία φέρει ομοιότητα στην αλληλουχία με την αιμοπηξίνη και τη βιτρονεκτίνη. Για το λόγο αυτό, η καρβόξυ-τελική περιοχή ονομάζεται επίσης και περιοχή τύπου αιμοπηξίνης. Το ένζυμο συντίθεται σε προενζυμική μορφή, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και εκκρίνεται από τα κύτταρα ως προένζυμο 57 kDa.Το ισοηλεκτρικό σημείο, pl, της MMP-3 από κουνέλι, είναι γύρω στο 5.48 (112). Υπάρχουν δύο δυνατές Ν-θέσεις γλυκοζυλίωσης και περίπου το 20% της proMMP-3 γλυκοζυλιώνεται και ανιχνεύεται ως μια μορφή 59 kDa (104). Το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου περιέχει 2 ιόντα Zn⁺⁺ : ένα στην ενεργό περιοχή του ενζύμου, όπου συνδέεται με μια περιοχή αλυσίδων με τρία κατάλοιπα Ιστιδίνης (την His201, His205, His211, ο αριθμός των οποίων έχει δοθεί σύμφωνα με την ανθρώπινη proMMP-3) και ένα δομικό Zn⁺⁺ που αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα στις θέσεις Asp153, His151, His166, και His179. Επιπλέον, τρία ιόντα Ca⁺⁺ συνδέονται, επίσης, στην καταλυτική περιοχή και με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η σταθερότητα του ενζύμου (104).

Το γονίδιο της MMP-3 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q22-q23 (113), στο οποίο βρίσκονται και τα γονίδια και άλλων μεταλλοπρωτεϊνασών, όπως της στρωμελυσίνης 2 (MMP-10), της ενδιάμεσης κολλαγενάσης (MMP-1), της κολλαγεννάσης 2 (MMP-8), της κολλαγενάσης 3 (MMP-13), της ματριλυσίνης 1 (MMP-7), της ματριλυσίνης 2 (MMP-26), της ελαστάσης των μακροφάγων (MMP-12) και της εναμελυσίνης (MMP-20). Η περιοχή του προαγωγέα περιέχει τα ενισχυτικά στοιχεία TATA, AP1 και PEA3 (105, 114). Το ένζυμο εκφράζεται σε ινοβλάστες, χονδροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα των αγγείων που αιματώνουν τους λείους μύς, οστεοβλάστες και κερατινοκύτταρα ως απόκριση στα κατάλληλα ερεθίσματα. Μία πληθώρα

παραγόντων έχουν δειχθεί ότι επάγουν την έκφραση της MMP-3 και είναι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο TNFα, ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (MMIF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο νεύρο-αυξητικός παράγοντας (NGF), η ογκοστατίνη M, ο παράγοντας που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα-1 (SCDF-1), η οξική μυριστική φορβόλη, η ακτινοβολία UV, οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος, οι κρύσταλλοι φωσφορικού ασβεστίου, το αμυλοειδές A του ορού, η β2-μικροσφαιρίνη, η Οστεονεκτίνη/SPARC, η ινοσυνδετίνη μέσω των θέσεων πρόσφυσης RGD, η ινοσυνδετίνη δομής A, η EMMPRIN (basigin/BM40), η ρελαξίνη, η βραδυκινίνη, η α-θρομβίνη και ο ογκογόνος κυτταρικός μετασχηματιστής (104).

Η ΜΜΡ-3, διασπά μία πληθώρα πρωτεϊνών είτε του εξωκυττάριου ή μηεξωκυττάριου χώρου καθώς και κυτταρικές επιφανειακές πρωτεΐνες. Επίσης, διασπά υποστρώματα όπως αυτά του τύπου κολλαγόνου Ι,ΙΙ,ΙΙΙ και Χ, τη λαμινίνη, την αγρινίνη, τη φιμπριλλίνη και την Ε-καντχερίνη. Το ένζυμο επίσης ενεργοποιεί τις προκολλαγονάσες MMP-1 και MMP-13, τη προζελατινάση Β (MMP-9) και τη MMP-1 (104).

Η MMP-3 εντοπίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών όπως στο μαστικό αδένα, στο πλακούντα, στο κυκλικό ενδομήτριο, στα κύτταρα του ωοθυλακίου των τριχών, στο αμφιβληστροειδή, στον οστεοαρθριτικό χόνδρο, στον ρευματοειδή αρθρικό υμένα, στην κήλη TOU μεσοσπονδύλιου δίσκου, στην αρτηριοσκληρωτική πλάκα, στην ανευρυσμιακή κοιλιακή αορτή, στα πολλαπλασιαζόμενα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στη βασική μεμβράνη, στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού μετά από τραυματισμό, στα γαστρεντερικά έλκη (π.χ. στη νόσο του Crohn, το πεπτικό έλκος και στην ελκώδη κολίτιδα) καθώς και σε ορισμένους όγκους (115). Η αύξηση της έκφρασης της ΜΜΡ-3 επάγει τη νεοπλασματική εξέλιξη των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, του ποντικού, μέσω της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπή που αποτελεί αποτέλεσμα της διάσπασης της Εκαντχερίνης, επιφέροντας απώλειες στις διακυτταρικές συνδέσεις. Αφού πραγματοποιηθεί αυτή η μετατροπή στα διαγονιδιακά ποντίκια οι φαινοτυπικές αλλαγές είναι πλέον ανεξάρτητες της ΜΜΡ-3 (115).

49

1.4.8 Στρωμελυσίνη 1 και Ελικοβακτήριο του πυλωρού

Όπως προαναφέρθηκε το *H. pylori* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για την πρόκληση επιφανειακής γαστρίτιδας και γαστρο-δωδεκαδακτυλικού έλκους και συντελεί σε αυξημένα επίπεδα κινδύνου για ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου (116). Όταν το *H. pylori* αποικίσει το βλεννογόνο, επάγει φλεγμονώδεις αποκρίσεις στα κύτταρα του ξενιστή που σχετίζονται με την αύξηση των επιπέδων κυτταροκινών στο χόριο (7). Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, IL-1β, IL-6 και IL-8 καθώς και ο TNF-a, έχουν εντοπιστεί κυρίως σε ασθενείς με cagA+ στελέχη *H. pylori* (117). Τα επίπεδα των MMP ρυθμίζονται από την έκκριση αυτών των φλεγμονωδών παραγόντων που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (117, 118). Πειραματική *in vitro* λοίμωξη *H. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα επάγει την έκφραση της MMP-3, η οποία μάλιστα δείχνει να σχετίζεται με την έκκριση των IL-1β και IL-8 (118).

Επιπλέον, έχει δείχθεί ότι αύξηση των επιπέδων της MMP-3 στους ορούς ασθενών με γαστρικό καρκίνο αλλά και ασθενών με γαστροεντερολογικές παθήσεις σχετίζονται με τη λοίμωξη του *Η. pylori* (119). Επιπλέον, η MMP-3 ενεργοποιεί τις προ-μορφές αρκετών μεταλλοπρωτεϊνασών (106) όπως της MMP-9 (120), της MMP-7 (121), της MMP-1 (122), της MMP-13 (123) και της MMP-2 (124). Όλες οι παραπάνω MMP, που έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί η MMP-3, έχουν φανεί να σχετίζονται με τη *Η. pylori* λοίμωξη και μάλιστα η δράση κάποιων από αυτές φαίνεται να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA (120). Επιπλέον, η στρωμελυσίνη-2 (MMP-10), η οποία εμφανίζει εξαιρετική ομολογία (82%) με τη στρωμελυσίνη-1 και έχει χαρακτηριστεί ως ισοένζυμό της (106), χρησιμοποιείται ως προγνωστικός καρκινικός δείκτης για γαστρικό καρκίνο (125).

1.4.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η παρούσα ερευνητική εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση της επίδρασης της βακτηριακής πρωτεΐνης CagA στην ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης-1 σε πειραματική in vitro λοίμωξη H. pylori γαστρικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών (AGS). Για τη λοίμωξη χρησιμοποιήθηκαν ισογενή μεταλλάγματα του στελέχους αναφοράς Η. pylori P12 που εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με διαφορετικό αριθμό, αφενός λειτουργικών θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C μη-φωσφορυλιώσιμων θέσεων EPIFA-C και αφετέρου μετά από αντικατάσταση της τυροσίνης (Υ) με φαινυλαλανίνη (F). Η ενεργοποίηση του νονιδίου της MMP-3 μετρήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό του m-RNA μέσω συγκριτικής ποσοτικής Real Time PCR. Η έκφραση της MMP-3 πρωτεΐνης μετρήθηκε αφενός στα ολικά κυτταρολύμματα και αφετέρου στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS, μετά από 24ωρη πειραματική λοίμωξη. Επιπλέον προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου MMP-3 με ζυμογραφία, με χρήση υποστρώματος καζεΐνης.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στελέχη *Η. pylori* που χρησιμοποιήθηκαν

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα στελέχη *Η. pylori* τα οποία κατασκευάστηκαν με βάση το στέλεχος αναφοράς *Η. pylori* P12, και των οποίων η παρασκευή περιγράφεται αναλυτικά στη δημοσίευση (126). Πιο συγκεκριμένα, τα παραχθέντα στελέχη *Η. pylori* εκφράζουν βακτηριακή πρωτεΐνη CagA, με μεταβλητό αριθμό λειτουργικών θέσεων φωσφωρυλίωσης EPIYA-C καθώς και με τις αντίστοιχες μη λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης EPIFA, στις οποίες η τυροσίνη (Υ) έχει αντικατασταθεί από φαινυλαλανίνη (F). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε στέλεχος που δεν εξέφραζε την πρωτεΐνη CagA (knock-out, CagAKO), μετά από απενεργοποίηση του γονιδίου *cagA* του βακτηρίου, αλλά και στέλεχος με μηλειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV (T4SS), μετά από απενεργοποίηση του ζαμέθοδο της παρεμβολής του γονιδίου της χλωραμφαινικόλης (127). Το στέλεχος *Η. pylori* P12 CagEKO παραχωρήθηκε ευγενώς από τον καθηγητή Rainer Haas.

2.1.1 Καλλιέργεια στελεχών Η. pylori

Η καλλιέργεια των στελεχών *Η. pylori*, πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό Columbia Blood Agar Base (Oxoid) εμπλουτισμένο με 7% αίμα αλόγου και 1% Vitox (Oxoid), παρουσία αντιβιοτικών: 10μg/ml βανκομυκίνη, 10μg/ml τριμεθοπρίμη, 10⁴ IU/liter πολυμυξίνη B, 2μg/ml αμφοτερικίνη B, 10μg/ml ναλιδιξικό οξύ, 30μg/ml βακιτρακίνη, 5μg/ml φλουοροκυτοσίνη (Sigma). Αναλυτικά, τα εν λόγω τρυβλία (τρυβλία CBA), τα οποία φυλάσσονταν στους 4°C, τοποθετούνταν ανάποδα σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C για 20 min με ελαφρά ανασηκωμένα τα καπάκια, έτσι ώστε να εξατμιστεί η τυχόν υγρασία που περιείχαν. Κατόπιν γινόταν ενοφθαλμισμός 150μl διαλύματος βακτηρίου που μόλις είχε αποψυχτεί από τους -80°C. Οι βακτηριακές καλλιέργειες στην συνέχεια τοποθετούνταν μέσα σε ειδικά αεροστεγή επωαστικά δοχεία, παρουσία καταλύτη ανάπτυξης μικροαερόφιλων συνθηκών (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) (Campygen, Oxoid) και επωάζονταν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C για 24 ή 48 ώρες.

2.1.2 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS πραγματοποιήθηκε με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 Glutamax I (Gibco), εμπλουτισμένο με 10% βόειο ορό (Gibco), παρουσία αντιβιοτικών (πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης 1% της Gibco) στους 37°C, σε ατμόσφαιρα CO₂ περιεκτικότητας 5%. Ειδικότερα, οι καλλιέργειες έγιναν σε φιάλες καλλιεργειών των 75cm² έως ότου τα κύτταρα να καλύψουν το 90% της επιφάνειας καλλιέργειας. Στην συνέχεια και αφού ξεπλένονταν με 5ml PBS (Gibco), χρησιμοποιούντο 2ml από το διάλυμα του ενζύμου θρυψίνη 0.05% (Gibco), για να αποκολληθούν από την πλαστική επιφάνεια. Για την ανακαλλιέργεια τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέες φιάλες καλλιεργειών με πλήρες θρεπτικό υλικό (10% ορό και αντιβιοτικά) σε συνολικό όγκο 20ml, σε αραιώσεις σύμφωνες με τις οδηγίες της ATCC για την κάθε κυτταρική σειρά (1:8 για τα AGS).

2.2 Κρυο-συντήρηση

2.2.1 Κρυο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Η συντήρηση των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών πραγματοποιείτο σε βαθιά κατάψυξη. Πιο συγκεκριμένα, μια φιάλη καλλιέργειας κυττάρων επιφάνειας 75cm², με 90% ποσοστό επικάλυψης, ξεπλένονταν με 5ml PBS και προστίθεντο 2ml από το ένζυμο θρυψίνη 0.05% (Gibco), για να αποκολληθούν τα κύτταρα από το πλαστικό υπόστρωμα. Μετά την αποκόλληση, τα κύτταρα επαναιωρούντο σε τελική συγκέντρωση 4x10⁶ κύτταρα/ml με θρεπτικό υλικό, περιεκτικότητας 20% σε ορό και 5% σε DMSO. Το κυτταρικό εναιώρημα φυλασσόταν ανά 1,8 ml σε αμπούλες κρυοσυντήρησης (cryotubes) της εταιρίας NUNC. Η διαδικασία της κατάψυξης κατά κανόνα συντελείτο εντός 24h στους -80°C, με την χρήση ειδικών δοχείων που επέτρεπαν την αργή και σταδιακή ψύξη των κυττάρων και στην συνέχεια τοποθέτηση τους στη βαθιά κατάψυξη σε δοχεία υγρού αζώτου στους -180°C.

2.2.2 Κρυο-συντήρηση στελεχών *Η. pylori*

Η φύλαξη των στελεχών *Η. pylori* πραγματοποιείτο σε αμπούλες κρυοσυντήρησης (cryotubes) με κατάψυξη στους -80°C, σε θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Broth (BHIB), παρουσία 20% γλυκερόλης. Αναλυτικά, το σύνολο της βιομάζας ενός τρυβλίου εικοσιτετράωρης καλλιέργειας επαναιωρείτο μέσα σε 1,8ml BHIB με 20% γλυκερόλη σε αμπούλες κρυοσυντήρησης. Η φύλαξη γινόταν στους -80°C.

2.3 Απομόνωση Νουκλεϊνικών οξέων

2.3.1 Απομόνωση γονιδιακού DNA βακτηρίων

Η απομόνωση του γονιδιακού DNA γινόταν συνήθως με χρήση του DNeasy Blood & Tissue εμπορικού kit της Qiagene, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, η βιομάζα μισής εικοσιτετράωρης καλλιέργειας επαναιωρείτο σε 1ml PBS. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 17,949g για 1min και πλύση τους με 1ml PBS (x2 φορές), καταβύθισή τους πάλι με τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, επαναιώρηση σε 200μl διαλύματος κυτταρικής λύσης ATL του κιτ, το οποίο εμπεριείχε 20μl πρωτεϊνάση K και επώαση κατά την διάρκεια της νύχτας στους 56°C. Την επόμενη ημέρα γινόταν προσθήκη διαλύματος άλατος 200μl AL του κιτ και 200μl απόλυτης αιθανόλης για την καταβύθιση του DNA. Ο συνολικός όγκος των 600μl τοποθετήθηκε σε μια στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 6,797g, προκειμένου το DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσαν πλύσεις του DNA με 500μl διαλύματος AW1 και με 500μl διαλύματος AW2. Η τελική έκκλουση του γονιδιακού DNA πραγματοποιείτο σε 200μl διαλύματος AE (10mM TrisHCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0).

2.3.2 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με το εμπορικό RNAeasy Mini kit της Qiagene. Περιληπτικά, γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα πυκνότητας μικρότερης από 5x10⁶ λύονταν με την προσθήκη 350μl εμπορικού διαλύματος κυτταρικής λύσης RTL το οποίο περιέχει χαοτροπικούς και αποδιατακτικούς παράγοντες για την επιτυχή λύση των κυττάρων. Κατόπιν ομογενοποίησης προστίθεντο 350μΙ αιθανόλης περιεκτικότητας 70%, για την τελική κατακρίμνηση του RNA. Το σύνολο του όγκου (700μΙ) διοχετευόταν σε στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 8.000g, προκειμένου το RNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσε πλύση του RNA με 350μl εμπορικού διαλύματος RW1 (ρυθμιστικό διάλυμα τα οποίο περιέχει άλατα γουανιδίνης), επώαση για 15min με 80μl DNase της Qiagene, προκειμένου να αποφευχθούν επιμολύνσεις από γονιδιακό DNA, και τελικές εκπλύσεις με 350μΙ εμπορικού διαλύματος RW1 και 500μΙ RPE (η κύρια λειτουργία του είναι να απομακρύνει τα ίχνη των αλάτων, τα οποία εξακολουθούν να είναι επί της στήλης λόγω των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν νωρίτερα στο πρωτόκολλο). Η τελική έκλουση του RNA γινόταν σε 40μl νερού το οποίο είχε υποστεί διαδικασία επεξεργασίας με διαιθυλοπυροανθρακικό (DEPC), για την εξουδετέρωση των ριβονουκλεασών.

2.4 Μέθοδοι αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

2.4.1 Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA

Για την αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA χρησιμοποιήθηκαν 50μl διαλύματος αντίδρασης, τα οποία περιείχαν 20mM Tris (pH 8,4), 50mM KCl, 3,75mM MgCl₂, 500μM δεοξυ-τριφωσφονουκλεοτίδια, 0,4μM εξαμερείς εκκινητές τυχαίου υβριδισμού (Invitrogen, Life Technologies), 80U RNase OUT ανασυνδυασμένου αναστολέα της ριβονουκλεάσης (Invitrogen, Life Technologies) και 22,2μl RNA. Οι κύκλοι αντίστροφης μεταγραφής αποτελούνταν από μια επώαση στους 25°C για 10min, ακολουθούμενη από μια ακόμα στους 37°C για 60sec και μια τελική επώαση στους 95°C για 5min.

2.4.2 Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR)

Η ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Agilent Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies). Χρησιμοποιήθηκαν 25μl διαλύματος αντίδρασης, τα οποία περιείχαν Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies) 0,5μΜ εκκινητές και 5μl cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2), έχουν στο παρελθόν περιγραφεί στην βιβλιογραφία τόσο για το ανθρώπινο γονίδιο της MMP-3 (48), όσο και για το γονίδιο της GAPDH (128). Οι κύκλοι πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 10min, ακολουθούμενο από 40 διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, ειδικού υβριδισμού στους 60°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 30sec. Μετά τον πολλαπλασιασμό ακολούθησε η μέτρηση της καμπύλης τήξης, αποτελούμενη από 95°C για 1min, ψύξη στους 55°C για 30s και τελικά μια αργή άνοδος της θερμοκρασίας στους 95°C με συνεχή μέτρηση του φθορισμού.

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR)			
Εκκινητές			
GAPDH	Forward primer	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	
	Reverse primer	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	
MMP-3	Forward primer	5'-TGGCATTCAGTCCCTCTATGG-3'	
	Reverse primer	5'-AGGACAAAGCAGGATCACAGTT-3'	

2.5 In vitro μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (AGS) μολύνθηκαν με *H. pylori* σε αναλογία βακτηρίων προς κύτταρα (MOI) 100:1. Αναλυτικά 4x10⁵ κύτταρα διαμοιράσθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων και αφέθηκαν να προσκολληθούν στην πλαστική επιφάνεια κατά την διάρκεια της νύχτας, όπως περιγράφεται παραπάνω (§2.1.3). Την επόμενη ημέρα και δύο ώρες πριν την μόλυνση, γινόταν απομάκρυνση του υπερκειμένου και αντικατάσταση αυτού με 2ml θρεπτικού υλικού (RPMI 1640) άνευ ορού και αντιβιοτικών, μετά από πλύση με 1ml PBS, και στη συνέχεια τα πιάτα μεταφέρονταν στον κλίβανο μέχρι τη χρήση τους (§2.1.3). Τα στελέχη *Η. pylori* επαναιωρούντο σε πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, σε ποσότητα τέτοια ώστε η θολερότητα του βακτηριακού διαλύματος να μετρηθεί στα 0,740 μετά από μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (600nm), που αντιστοιχεί σε βακτηριακή συγκέντρωση περίπου 10⁸cfu/ml. Ακολουθούσε επώαση για 1h στους 37°C υπό ανάδευση σε 27g, προκειμένου να προσαρμοστούν τα βακτήρια στο νέο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, τα βακτήρια εκπλύνονταν με 500μl PBS και επαναιωρούντο σε 500μl θρεπτικού υλικού (RPMI 1640) άνευ ορού. Η απουσία ορού στα πειράματα αυτά ήταν επιβεβλημένη γιατί παρουσία του επηράζει τα αποτελέσματα. Για την τελική πειραματική μόλυνση των κυττάρων AGS χρησιμοπιείτο βακτηριακό εναιώρημα όγκου 100μl, για κάθε κυψελλίδα του πιάτου.

2.6 Ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών και ενζυματικής δραστηριότητας

2.6.1 Λύση κυττάρων

Η λύση των επιμολυσμένων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων γινόταν αναλόγως της περίπτωσης, είτε σε πλήρως, είτε σε μη, αποδιατακτικές συνθήκες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν, το πλήρως αποδιατακτικό διάλυμα RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.2, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 2 mM L-δι-θειοθρεϊτόλης) και το μη αποδιατακτικό NP-40 (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH8.0, 1% NP-40, 2mM L-DTT) παρουσία και στα δύο αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (Πίνακας 3). Αναλυτικά, μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού ακολουθούσε πλύση των κυττάρων με PBS (1ml για πιάτο 6-κυψελίδων, 2 ml για φιάλη καλλιέργειας των 25cm² και 5ml για φιάλη καλλιέργειας των 75cm²) και προσθήκη του κατάλληλου διαλύματος λύσης (200μ) για πιάτο 6-κυψελίδων, 300μ) για φλάσκα των 25cm² και 500μ) για φλάσκα των 75cm²). Ακολουθούσε αποκόλληση του συνόλου των κυττάρων με χρήση ειδικού πλαστικού αποξέστη (plastic scraper), μεταφορά σε καθαρό μικροσωλήνα, επώαση για 30min πάνω σε πάγο, για την πλήρη λύση των

Πίνακας 3. Οι αναστολείς που χρ	lίνακας 3. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού		
Αναστολέας	Δραστικότητα	Συγκέντρωση	
		εργασίας	
Sodium orthovanadate	Γενικός αναστολέας	2 mM	
Na ₃ VO ₄	φωσφατασών		
β-glycerolphosphate	Γενικός αναστολέας	1mM	
	φωσφατασών		
NaF	Γενικός αναστολέας	10mM	
	φωσφατασών		
Leupeptin	Γενικός αναστολέας	10 µg/ml	
	πρωτεασών		
Aprotinin	Γενικός αναστολέας	10 µg/ml	
	πρωτεασών		
Pefabloc SC	Γενικός αναστολέας	250 µg/ml	
	πρωτεασών		
5Z-7- Oxozeaenol	Ειδικός αναστολέας κινάσης	30nM-300nM	
	TAK1		

κυττάρων, φυγοκέντρηση 17,969g για 30 min, προκειμένου να καθιζάνουν τα

νουκλεϊνικά οξέα και τελική μεταφορά του υπερκειμένου σε νέους κενούς μικροσωλήνες για φύλαξη στους -20°C.

2.6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κυτταρολυμάτων χρησιμοποιήθηκε η εμπορική μέθοδος Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). Η δοκιμασία ανίχνευσης πρωτεΐνης με το BCA συνδυάζει, την αναγωγή του Cu²⁺ σε Cu¹⁺, όταν είναι συνδεδεμένος με πεπτιδικούς δεσμούς στη πρωτεΐνη όταν βρεθεί σε ένα αλκαλικό μέσο, με την εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του Cu¹⁺ από το δικιγχονινικού οξύ (BSA). Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία χηλικού συμπλόκου μεταξύ του χαλκού ο οποίος συνδέεται με πεπτιδικό δεσμό με την πρωτεΐνη, σε αλκαλικό περιβάλλον έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα γαλάζιο σύμπλοκο. Σε αυτή την αντίδραση, γνωστή ως αντίδραση της διουρίας, πεπτίδια που περιέχουν τρία ή περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέων σχηματίζουν ένα έγχρωμο σύμπλοκο χηλικής ενώσεως με τα ιόντα δισθενούς χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον που περιέχει τρυγικό κάλιο νάτριο. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης για την ανάπτυξη χρώματος, το δικινχονινικό οξύ (BCA) αντιδρά με το Cu¹⁺ που σχηματίστηκε στο πρώτο στάδιο. Το έντονο μωβ προϊόν είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης από τη δημιουργία χηλικού συμπλόκου των δύο μορίων, του BCA με το Cu¹⁺. Το σύμπλοκο BCA/Cu¹⁺ είναι υδατοδιαλυτό και εμφανίζει ισχυρή γραμμική απορρόφηση στα 562nm με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Το αντιδραστήριο BCA είναι περίπου 100 φορές πιο ευαίσθητο (κατώτερο όριο ανίχνευσης) από το ωχρό γαλάζιο χρώμα της πρώτης αντίδρασης. Η αντίδραση που οδηγεί στο σχηματισμό χρώματος BCA επηρεάζεται έντονα από τέσσερα υπολείμματα αμινοξέων (κυστεΐνης ή κυστίνης, τυροσίνης, και τρυπτοφάνης), στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης (47). Σε κάθε προσδιορισμό για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιείτο πρότυπο αναφοράς δείγμα αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης 2,0 mg/ml. Συνοπτικά, σε τρυβλίο 96 φρεατίων γίνονταν υποδιπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις σε απεσταγμένο νερό, δείγματος ολικής πρωτεΐνης ή προτύπου δείγματος αλβουμίνης, μετά από αραίωση του αρχικού δείγματος κατά 1:10. Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων του εμπορικού κιτ ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους 37°C για δύο ώρες και φωτομέτρησή τους σε φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης πλακών 96κυψελίδων στα 540nm (129).

2.6.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) κατατάσσεται στις τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων σε κυτταρικά δείγματα ή δείγματα ιστών. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην μετανάστευση των ηλεκτρικά φορτισμένων πρωτεϊνών του δείγματος μέσω πηκτής πολυακρυλαμιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες αποδιατάσσονται παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS και σχηματίζουν ένα ηλεκτραρνητικό σύμπλοκο SDS-πρωτεϊνης, το οποίο μεταναστεύει μέσα από την πορώδη πηκτή. Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεϊνες με πρόσδεσή του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα σε αναλογία μάζας SDS προς πρωτεΐνη 1,4:1. Συνεπώς, όλες οι πρωτεϊνες ανεξάρτητα από την

αλληλουχία τους φορτίζονται αρνητικά και όσο πιο μεγάλη είναι η πρωτεΐνη τόσο μεγαλύτερο είναι το αρνητικό φορτίο. Ένας αναγωγικός παράγοντας (2 μερκαπτοαιθανόλη ή DTT-diothreitol) προστίθεται για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών (S-S). Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν με ταχύτητα ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης υπολογίζεται σε σχέση με την ηλεκτροφορητική μετανάστευση πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους και η σχετική κινητικότητα μιας πρωτεΐνης είναι αντίστροφος ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πολυακρυλαμίδη χρησιμοποιείται για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση ενός διαλύματος πρωτεϊνών καθώς και για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης. Οι πηκτές ακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό της ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο διασταύρωσης Ν,Ν μεθυλένο-δισακρυλαμίδιο. Η αντίδραση πολυμερισμού διευκολύνεται από το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) που προκαλεί την δημιουργία ελευθέρων ριζών, και του καταλύτη N,N τετραμεθυλ-ενο-αιθυλ-ενο-διαμίνη (TEMED) που καταλύει την μετάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν. Για την δημιουργία της πηκτής απαιτούνται δύο ειδικές γυάλινες πλάκες και η πηκτή αποτελείται από δύο πηκτώματα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) που είναι η πηκτή εναπόθεσης, ώστε όλες οι πρωτεΐνες να ξεκινήσουν από το ίδιο σημείο και να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα διαχωρισμού. Η μεθοδολογία βασίστηκε στο βιβλίο Protein Methods των Bollag και συν (130).

Ολική πρωτεΐνη προερχόμενη από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα ή ευκαρυωτικά κύτταρα που υπέστησαν μόλυνση, διαχωρίστηκε στις επιμέρους πρωτεΐνες με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Ακολούθησε μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF και ανοσοεντόπιση με επώαση με πρωτοταγή αντισώματα (Πίνακας 4) και δευτεροταγή αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση του ραδικιού (Πίνακας 4). Οι υβριδισμένες πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL) και το παραγόμενο φθορίζον σήμα αποτυπώθηκε με την χρήση φιλμ ραδιογραφίας (Fuji RX films).

Αντίσωμα	Ξενιστής	Εφαρμογέ	Συγκέντρω	Εταιρία
		ς	ση	
a-MMP-3	Ποντίκι	W.B.	1:100	Santa-Cruz
a-GAPDH	Ποντίκι	W.B.	1:60.000	Merck-Millipore
α-CagA (Polyclonal)	Κουνέλι	W.B.	1:6.000	Austral
				Biologicals
α-CagA-pY972	Ποντίκι	W.B.	1:500	-*
α -rabbit IgG Alexa Fluor 546	Αίγα	IF-IC	1:1000	Invitrogen
α-rabbit IgG HRP	Αίγα	W.B.	1:40.000	Jackson Lab.
α-mouse IgG HRP	Αίγα	W.B.	1:40.000	Jackson Lab.
**0				

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

^{**8}Παρασχέθηκε από τον Καθηγητή Steffen Backert

2.6.4 Ανίχνευση ενζυμικής δραστικότητας με ζυμόγραμμα

Ολική πρωτεΐνη προερχόμενη από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα που υπέστησαν μόλυνση, διαχωρίστηκε στις επιμέρους πρωτεΐνες Jμ ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) το οποίο περιείχε και υπόστρωμα καζεΐνης (5%), το οποίο συμπολυμερίζεται με το ακρυλαμίδιο. Στο τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης δεν περιείχετο αναγωγικό μέσο, όπως μερκαμπτοαιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και καθίστανται ανενεργές. Η ενεργοποίηση της προ-μορφής των μεταλλοπρωτεϊνασών γινόταν μέσω αποδιάταξης από το SDS, του δεσμού κυστείνης-ψευδαργύρου, ο οποίος συνδέει τη Cys του προπεπτιδίου με το ιόν Zn²⁺, που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα ξεπλένονταν με Triton[®] X-100 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του SDS και την επαναδιάταξη της ενεργού μορφής του ενζύμου. Ακολουθούσε ενεργοποίηση του ενζύμου σε κατάλληλο υδατικό διάλυμα ενεργοποίησης (Tris base (50mM), NaCl (200mM), 0.7mg ZnCl2, CaCl₂·2H2O (5mM), NaN₃ (0.02%)) στους 37°C για 16-17 ώρες και

χρώση του πηκτώματος με Coomasie[®] Blue για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το πήκτωμα αποχρωματίζόταν με έκπλυση σε υδατικό διάλυμα 10% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος.

2.7 Σήμανση *Η. pylori* με CFDA-SE

Η επισήμανση των βακτηρίων με CFDA-SE (διοξική καρβοξυφθορεσκεϊνη ηλεκτριμιδυλο εστέρα) έγινε με την μέθοδο των Nolan *και συν.* (131). Βακτηριακό εναιώρημα (10⁸ cfu/ml) μετά από πλύση με PBS επωάστηκε στους 37°C για 20 min με διάλυμα CFDA-SE 5 mM (Fluka-Sigma). Κατόπιν, τα βακτήρια καταβυθίστηκαν με ήπια φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε 1 ml RPMI 1640 περιεκτικότητας σε FBS 10% για την χρήση τους σε πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης.

2.8 Ανοσοφθορισμός και Συνεστιακή Μικροσκοπία

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (1.5x10⁵) χρησιμοποιήθηκαν για την επικάλυψη πιάτων 24-κυψελίδων, στα οποία προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί στρογγυλές καλυπτρίδες διαμέτρου 11 mm. Μετά από επιμόλυνση με *H. pylori* βακτήρια σημασμένα ή μη με CFDA-SE σε MOI 100, για 4 ώρες στους 37°C, τα κύτταρα πλένονταν δύο φορές με PBS, και μονιμοποιούντο με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% και σακχαρόζης 4% σε PBS. Ακολουθούσε κατεργασία με διάλυμα Triton X-100 0.1% σε PBS. Τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλογίες χρήσης, περιγράφονται στον Πίνακας 3. Η μικροσκοπική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP κάνοντας χρήση μεγεθυντικού φακού 63×.

2.9 Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική η οποία χρησιμεύει στην καταμέτρηση, την ταυτοποίηση, αλλά και το διαχωρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων που είναι αιωρημένα σε υγρό εν ροή και βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην αυτοματοποίηση της ανάλυσης και του διαχωρισμού κυττάρων σημασμένων με φθορίζοντα αντισώματα. Επιτρέπει την ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση των φυσικών ή και των χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν μέσα από ένα οπτικό ή και ηλεκτρονικό σύστημα ανίχνευσης.

Μια δέσμη laser καθορισμένου μήκους κύματος κατευθύνεται σε ένα υδροδυναμικά εστιασμένο ρεύμα κυττάρων που είναι σε εναιώρημα. Μία σειρά από ανιχνευτές βρίσκονται στο σημείο όπου το εναιώρημα διέρχεται μέσα από την ακτίνα του laser: ένας ανιχνευτής στην ίδια ευθεία με την πηγή του φωτός (Forward Scatter or FSC) και αρκετοί ανιχνευτές κάθετοι σε αυτήν (Side Scatter (SSC) καθώς επίσης και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο διαμέτρου 0.2-150μm που διέρχεται διαμέσου της δέσμης του laser, σκεδάζει το φως με κάποιο τρόπο, ενώ ταυτόχρονα τα φθορίζοντα χημικά μόρια τα οποία υπάρχουν στα διερχόμενα σωματίδια ή είναι προσκολλημένα σε αυτά, μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως σε υψηλότερο μήκος κύματος από αυτό της φωτεινής πηγής. Ο συνδυασμός του σκεδαζόμενου φωτός και του φθορισμού καταγράφεται από τους ανιχνευτές (ένας για κάθε μια κορυφή εκπομπής φθορισμού) και αναλύεται. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των διερχόμενων σωματιδίων. Η FSC σκέδαση συσχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου ενώ η SSC εξαρτάται από την πολυπλοκότητα που απαντάται στο εσωτερικό του διερχόμενου σωματιδίου (πχ το σχήμα του πυρήνα, τον αριθμό και το είδος των κυτταροπλασματικών κοκκίων ή την αδρότητα της κυτταρικής μεμβράνης).

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (9x10⁵), τα οποία προηγουμένως είχαν μολυνθεί με σημασμένα με CFDA-SE *H. pylori* βακτήρια, για διάστημα έως 1 ώρα στις κατάλληλες χρονικές στιγμές, αποκολλήθηκαν από τα τρυβλία με χρήση 1ml τρυψίνης-EDTA 0.5% ανά κυψελίδα, μετά από πλύση τρείς φορές με 1ml PBS. Η απενεργοποίηση του ενζύμου γινόταν με προσθήκη 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Η απομόνωση των βακτηρίων γινόταν με φυγοκέντρηση για 5min στις 13,000rpm και τελική επαναιώρηση σε 1ml PBS. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur (Becton Dickinson) αναλύοντας 10.000 κύτταρα ανά δείγμα.

2.10 Υπολογισμός ρυθμού ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού

Για τον υπολογισμό του ρυθμού ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *Η. pylori* καλλιεργήθηκαν οι μεταλλαγμένοι κλώνοι του στελέχους αναφοράς P12, καθώς και το γονικό στέλεχος. Αρχικά, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία CBA για 48 ώρες και στη συνέχεια εναιωρήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με Brain Heart infusion Broth (BHIB), αρχικής θολερότητας (600nm) 0,200 και σε επιλεγμένες χρονικές στιγμές προσδιορίστηκε ο αριθμός των βιώσιμων βακτηρίων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες *Η. pylori* στους 37°C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες σε 10ml BIHB, το οποίο περιείχε και 10% FBS, υπό συνεχή ανάδευση. Οι ρυθμοί ανάπτυξης (k) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο $N=N_0e^{kt}$, όπου N₀ ήταν ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός (σε CFU) και N ο αριθμός των βακτηρίων (σε cfu) στο επιλεγμένο χρονικό σημείο t.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιλογή λειτουργικών μεταλλαγμένων βακτηρίων.

Μετά την παραγωγή των γενετικά μεταλλαγμένων ισογονιδιακών βακτηρίων *H. pylori* που κατασκευάστηκαν στο εργαστήριό, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από λειτουργικές δοκιμασίες σε όλους τους διαφορετικούς κλώνους, προκειμένου να επιλεχθούν οι πλέον κατάλληλοι για κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος (126). Η επιλογή έγινε με κριτήρια την ικανότητα έκφρασης της πρωτεΐνης CagA, του βακτηριακού ρυθμού ανάπτυξης, του ποσοστού επαγωγής κυτταροσκελετικών μεταβολών μετά από πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, τη λειτουργικότητα του τύπου IV εκκριτικού συστήματος των βακτηρίων, την επιτυχή μεταφορά της πρωτεΐνης CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση της σε θέσεις τυροσίνης.

3.1.1 Επιλογή στελεχών με βάση την ικανότητα έκφρασης της πρωτεΐνης CagA

Με σκοπό την επιλογή των πλέον κατάλληλων λειτουργικών στελεχών *Η. pylori* εξετάστηκαν τουλάχιστον 8 κλώνοι ανά συνδυασμό EPIYA της CagA και προσδιορίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, αρχικά σε βακτηριακά κυτταρολύματα (Εικόνα 12A) και κατόπιν σε κυτταρολύματα γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS μετά από μόλυνσή τους με όλους τους κλώνους των διαφορετικών μεταλλαγμένων βακτηρίων (Εικόνα 12B). Η έκφραση της πρωτεΐνης CagA στα βακτηριακά στελέχη βρέθηκε να είναι συγκρίσιμη με εκείνη του γονικού στελέχους (Εικόνα 12A). Ήταν εμφανής η αναμενόμενη διαφορά μεγέθους μεταξύ των πρωτεϊνών ανάλογα με τον διαφορετικό αριθμό EPIYA-C θέσεων φωσφορυλίωσης στην CagA (Εικόνα 12A). Στα βακτηριακά κυτταρολύματα παρατηρήθηκαν ανά δείγμα, υποπροϊόντα της πρωτεϊνοσύνθεσης της CagA (Εικόνα 12A) όχι όμως και στα ολικά κυτταρολύματα μετά από μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 12B), καθόσον μόνο οι ώριμες μορφές της CagA έχουν την δυνατότητα μεταφοράς μέσω του βακτηριακού λειτουργικού συστήματος μεταφοράς. Με βάση τα αποτελέσματα στα ολικά κυτταρολύματα μετά από μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 12B) επιλέχθηκε ένας κλώνος από κάθε διαφορετικό μεταλλαγμένο βακτήριο με κριτήριο την ισόποση έκφραση της πρωτεΐνης CagA (Εικόνα 12B) (126).



Εικόνα 12: Ανοσοστύπωση κατά western με α-CagA και α-GAPDH αντισώματα σε (A) κυτταρολυμάτα όλων των μεταλλαγμένων ισογονιδιακών βακτηρίων και (B) κυτταρολύματα AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με όλους τους κλώνους των μεταλλαγμένων στελεχών

3.1.2 Αξιολόγηση του βακτηριακού ρυθμού ανάπτυξης

Στους επιλεγμένους κλώνους προσδιορίστηκαν οι ρυθμοί ανάπτυξης σε σχέση με το γονικό P12 στέλεχος. Χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες *H.pylori* υπό μικροαερόφιλες συνθήκες και συνεχή ανάδευση και προσδιορίστηκε ο αριθμός των βιώσιμων βακτηρίων στις 5 και στις 10 ώρες. Οι ρυθμοί ανάπτυξης στην λογαριθμική και στατική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων αναφέρονται στον Πίνακα 5. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στους ρυθμούς ανάπτυξης μεταξύ του πατρικού στελέχους P12 και των μεταλλαγμένων στελεχών P12.

	Ρυθμός ανάπτυξης	
	5h	10h
P12B	2.22	0.00
P12ABC	2.16	0.02
P12ABCC	2.25	0.01
P12ABCCC	2.12	0.00
P12ABF	2.20	0.03
P12ABFF	2.19	0.02
P12ABFFF	2.26	-0.07

Πίνακας 5. Οι ρυθμοί ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *Η. pylori*

3.1.3 Προσδιορισμός του ποσοστού προσκόλλησης των βακτηρίων στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

Για να αποκλειστούν οι διαφορές στην ικανότητα προσκόλλησης των παραχθέντων βακτηρίων στα AGS κύτταρα, προχωρήσαμε σε σήμανση των μεταλλαγμένων *Η. pylori* στελεχών με φθορίζοντα παράγοντα CFDA-SE και στην συνέχεια προσδιορίσαμε το ποσοστό προσκόλλησης των *Η. pylori* σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα με κυτταρομετρία ροής (131). Η προσκόλληση (%) αναφέρεται στο ποσοστό των κυττάρων AGS με προσκολλημένα φθορίζοντα βακτήρια. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ του πατρικού στελέχους P12, του P12CagAKO και των διαφορετικών CagA μεταλλαγμένων στελεχών (Σχήμα 1). Το ποσοστό προσκόλλησης όλων των στελεχών *Η. pylori* προσδιορίστηκε ότι είναι πάνω από 55% μέσα στην πρώτη μισή ώρα μετά τη μόλυνση και έβαινε αυξανόμενο περίπου στα 65-70 % μετά από 2 ώρες επώασης.



Σχήμα 1: Η προσκόλληση των CFDA-SE-σημασμένων *Η. pylori* μεταλλαγμένων στελεχών επάνω σε κύτταρα AGS προσδιορίστηκε με ανάλυση FACS. Η προσκόλληση (%) αναφέρεται στο ποσοστό των κυττάρων AGS τα οποία ανιχνεύθηκαν να φέρουν δεσμευμένο επάνω τους φθορίζοντα βακτηρίδια.

3.1.4 Προσδιορισμός της λειτουργικότητας του τύπου IV βακτηριακού εκκριτικού συστήματος, της επιτυχούς μεταφοράς της CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και της φωσφορυλίωσης της σε θέσεις τυροσίνης

Για την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας του τύπου IV βακτηριακού εκκριτικού συστήματος, έγινε αρχική σήμανση με φθορίζουσα CFDA-SE χρώση των βακτηρίων (πράσινα). Ακολούθησε πειραματική λοίμωξη των επιθηλιακών κυττάρων με τα βακτήρια και μετά παρέλευση 4ώρου στα δείγματα έγινε ανοσοπροσδιορισμός της πρωτεΐνης CagA χρησιμοποιώντας αντι-CagA αντίσωμα και δευτερεύον αντίσωμα Alexa Fluor 546 goat α-rabbit IgG που φθορίζει στο κόκκινο. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή



Εικόνα 13: Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας μετά από ανάλυση ανασυγκρότησης εικόνας. Η πρωτεΐνη CagA έχει σημανθεί με το αντίσωμα a-rabbit IgG Alexa Fluor 546.
μικροσκοπία. Σε ανάλυση ανασυγκρότησης εικόνας στον z-άξονα στο σημείο προσκόλλησης των βακτηρίων στη κυτταρική μεμβράνη, εμφανίστηκαν χαρακτηριστικές κίτρινες προεκβολές, ανάμεσα στα προσκολλημένα (πράσινα) βακτήρια και στη εκκρινόμενη πρωτεΐνη CagA (κόκκινη) υποδηλώνοντας την δόμηση ενός λειτουργικού T4SS, το οποίο επιτυχώς μεταφέρει την πρωτεΐνη CagA στο εσωτερικό των κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή κατέστη εφικτή για όλα τα διαφορετικά ισογονιδιακά μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία φέρουν CagA με μεταβλητό αριθμό μοτίβων ΕΡΙΥΑ καθώς και για τα μη-φωσφορυλιώσιμα μεταλλάγματα EPIFA της CagA. Αντιθέτως, καμία τέτοια κίτρινη προεκβολή δεν ανιχνεύθηκε στα προσκολλημένα σε κύτταρα βακτήρια, τόσο στην περίπτωση του μη λειτουργικού στελέχους P12CagEKO όσο και του P12CagAKO, το οποίο δεν εκφράζει πρωτεΐνη CagA (Εικόνα 13).

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA προσδιορίστηκε αφενός, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιώντας αντίσωμα αντι-τυροσίνης ΡΥ20 και ακόλουθη ανοσοανίχνευση της CagA με ειδικό αντίσωμα α-CagA (Εικόνα 14Γ), και αφετέρου χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα αντι-phospho-CagA Tyr972 που αναγνωρίζει μόνο την φωσφορυλιωμένη μορφή της συγκεκριμένης ΕΡΙΥΑ-C θέσης (Εικόνα 14Δ). Σε όλες τις περιπτώσεις κατέστη εφικτό να ανιχνευτεί φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη CagA στα κατάλοιπα τυροσίνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είχε με επιτυχία μεταφερθεί στο εσωτερικό των κυττάρων και κατά συνέπεια φωσφορυλιωθεί από τις ενδοκυττάριες κινάσες των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 14Γ και Δ). Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να επάγουν κυτταροσκελετικές μεταβολές μετά από 24ωρη πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 14Α).

Παρατηρήθηκε εξάρτηση της εμφάνισης κυτταροσκελετικών μεταβολών σε σχέση με τον αριθμό των ΕΡΙΥΑ-C θέσεων και με την ικανότητα φωσφορυλίωσής τους (Εικόνα 14Β), όπως αναμενόταν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, κυτταροσκελετικές μεταβολές, αντίστοιχες προς τον αριθμό των ΕΡΙΥΑ-C μοτίβων φωσφορυλίωσης, παρατηρήθηκαν μόνο για τα βακτηριακά στελέχη Ρ12ΑΒC, Ρ12ΑΒCC (wt) και Ρ12ΑΒCCC

72

(Εικόνα 14Α, Β). Αντιθέτως, τα στελέχη P12CagAKO, P12AB, τα οποία στερούνται λειτουργικών EPIYA-C μοτίβων, ή τα P12ABF, P12ABFF και P12ABFF μεταλλαγμένα στελέχη με μη-φωσφορυλιώσιμες EPIFA-C μορφές μοτίβων, απέτυχαν να επάγουν κυτταροσκελετικές μεταβολές στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (Εικόνα 14Α, Β).



Εικόνα 14: (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με μεταλλαγμένα στελέσχη (Β) Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν τον ραμφοειδή φαινότυπο. (Γ) Ανοσοκατακρήμνιση όλων των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και ανοσοστύπωση κατά western με α-CagA αντίσωμα. (Δ) Ανοσοστύπωση κατά western κυτταρολυμάτων AGS κυττάρων μετά από μόλυνση με όλα τα μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη με τα αντισώματα .α-CagA-pY972, α-CagA και α-GAPDH αντισώματα.

3.2 Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C συμβάλλει στην μεταγραφική ενεργοποίηση της στρωμελυσίνης 1 (MMP-3).

Για την μελέτη της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις ΕΡΙΥΑ-C στην μεταγραφή του γονιδίου της ΜΜΡ-3, έγινε επιμόλυνση AGS κυττάρων με μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη *Η. pylori*, τα οποία είτε δεν παρήγαγαν την πρωτεΐνη CagA (P12CagAKO) είτε δεν ήταν δυνατό να επάγουν το λειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV (T4SS) (CagEKO) είτε εξέφραζαν την CagA με μεταβλητό αριθμό θέσεων ΕΡΙΥΑ-C (P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) είτε τέλος, με τα αντίστοιχα μη φωσφορυλιώσιμα ανάλογά τους (P12ABF, P12ABFF, P12ABFF). Στην συνέχεια έγινε απομόνωση RNA σε χρονικές στιγμές 2, 4 και 24 ωρών μετά την πειραματική μόλυνση και μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της MMP-3 με την χρήση Real Time PCR. Τα στελέχη P12ABCCC P12ABCC επήγαγαν τα υψηλότερα επίπεδα της μεταγραφικής και ενεργοποίησης του γονιδίου των MMP-3 (100- και 50- φορές, αντίστοιχα) σε σύγκριση με μη μολυσμένα κύτταρα στις 24 ώρες μετά τη μόλυνση (Σχήμα 2). Αντιθέτως, στέλεχος τо Ρ12ΑΒ, το οποίο στερείται αλληλουχιών φωσφορυλίωσης EPIYA-C στην CagA πρωτεΐνη, αλλά και το στέλεχος P12ABC, που έχει μόνο μια θέση φωσφορυλίωσης EPIYA-C, επήγαγε την μεταγραφική ενεργοποίηση της MMP-3 σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με εκείνες που επάγονται από τα στελέχη P12ABCCC (p=0,002 και p<0,001) και P12ABCC (p= 0,007 και p<0,001), μια στατιστικά σημαντική μείωση. Στις 4 ώρες μετά την μόλυνση, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ΜΜΡ-3 που προκλήθηκε από το στέλεχος Ρ12ΑΒCCC, ήταν σαφώς μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρήθηκε στο στέλεχος P12ABCC (p = 0,001) (Σχήμα 2). Τα στελέχη P12CagAKO, P12CagEKO, P12AB, P12ABC, P12ABF, P12ABFF και P12ABFFF επήγαγαν το γονίδιο της MMP-3 σε αρκετά χαμηλότερο επίπεδο σε σχέση με τα στελέχη P12ABCC και P12ABCCC (Σχήμα 2). Αρκετά ενδιαφέρουσα είναι και η παρατήρηση ότι, η ενεργοποίηση του γονιδίου της ΜΜΡ-3 από το στέλεχος Ρ12ΑΒ και

P12ABFFF είναι παρόμοια για τα δύο στελέχη στις 24 ώρες, ενώ στις 4 ώρες το P12AB εμφανίζει υψηλότερη ενεργοποίηση από το P12ABFFF.



Σχήμα 2: Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της MMP-3 σε AGS κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η μεταγραφική ενεργοποίηση καθορίστηκε με την χρήση Quantitative Real Time PCR σε 2, 4 και 24h ώρες μετά την μόλυνση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student t-test και τα επίπεδα σημαντικότητας συμβολίζονται ως εξής *<0.005, **<0.01, ***<0.05.

3.2.1 Επίδραση της πρωτεΐνης CagA στην έκφραση της MMP-3 σε κυτταρολύματα AGS κυττάρων.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε την έκφραση της ΜΜΡ-3 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, έγινε πειραματική μόλυνση AGS κυττάρων με τα ισογονιδιακά στελέχη *Η. pylori* P12CagAKO, P12CagEKO, P12AB, P12ABC, P12ABCC (wt.), P12ABCCC, P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF. Ύστερα από 24 ώρες επώασης συλλέχθηκαν τα ολικά κυτταρολύματα πρωτεϊνών και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε αυτά. Ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης MMP-3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε μη αναγωγικές συνθήκες (απουσία μερκαπτοαιθανόλης) και οπτικοποίηση των υβριδισμένων πρωτεϊνών Jμ тη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL). Στα αποτελέσματα, φαίνεται ότι στα κυτταρολύματα από τα μη μολυσμένα κύτταρα, δεν εκφράζεται η MMP-3 (Εικόνα 14Α). Αντίθετα, έκφραση MMP-3 ανιχνεύθηκε μετά από πειραματική λοίμωξη *Η. pylori* με στελέχη που είτε δεν εκφράζουν την CagA πρωτεΐνη (P12CagAKO), ή δεν επάγουν το λειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV (P12CagEKO) (Εικόνα 15Α). Σαφώς μεγαλύτερη έκφραση MMP-3 παρατηρήθηκε μετά από μόλυνση με τα CagA-θετικά στελέχη ανεξάρτητα από τον αριθμό ή την λειτουργικότητα των θέσεων φωσφορυλίωσης (Εικόνα 15Α, Β).



Εικόνα 15: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε ολικά κυτταρολύματων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από μόλυνση με στελέχη του *Η. pylori*. Εικόνα 15Α: Παρατηρείται έκφραση της MMP-3 και GAPDH πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα a-MMP-3 και a-GAPDH και τα στελέχη (P12CagAKO, P12CagEKO, P12AB, P12ABC, P12ABCC (wt.), P12ABCCC). Εικόνα 15Β: Παρατηρείται έκφραση της MMP-3 και GAPDH πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα a-MMP-3 και a-GAPDH και τα στελέχη (P12CagAKO, P12CagEKO, P12AB, P12ABC, P12ABCC (wt.), P12ABCCC).

3.2.2 Επίδραση των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C, της πρωτεΐνης CagA, στην έκφραση της MMP-3 στα υπερκείμενα AGS κυττάρων.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε την έκφραση της MMP-3 στον εξωκυττάριο χώρο των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, έγινε πειραματική μόλυνση AGS επιθηλιακών κυττάρων με τα ισογονιδιακά στελέχη *Η. pylori*, P12CagAKO, P12CagEKO, P12AB, P12ABC, P12ABCC (wt.), P12ABCCC, P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF. Ύστερα από 24ώρη επώαση συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Στη συνέχεια, προσδιορίσθηκε η πρωτεϊνική τους συγκέντρωση και ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης MMP-3 και a-GAPDH με ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών κατά Western, σε μη αναγωγικές συνθήκες, με χρήση των αντίστοιχων ειδικών αντισωμάτων. Η οπτικοποίηση των υβριδισμένων πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειφωταύγειας.

Δεν παρατηρήθηκε έκφραση MMP-3 στα υπερκείμενα αμόλυντων κυττάρων (Εικόνα 16). Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα MMP-3 παρατηρήθηκαν στα υπερκείμενα επιθηλιακών κυττάρων που είχαν υποστεί πειραματική μόλυνση με τα στελέχη που είτε δεν εκφράζουν την CagA πρωτεΐνη (P12CagAKO), ή δεν επάγουν το λειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV (P12CagEKO) (Εικόνα 16). Πολύ υψηλότερη έκφραση MMP-3 παρατηρήθηκε στα υπερκείμενα κυττάρων που μολύνθηκαν με CagA-θετικά στελέχη, ανεξάρτητα από τον αριθμό των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C της πρωτεΐνης CagA. Αντίθετα πολύ χαμηλότερη έκφραση MMP-3 παρατηρήθηκε στα υπερκείμενα κυττάρων που μολύνθηκαν με CagA-θετικά στελέχη που περιείχαν μη φωσφορυλιώσιμες θέσεις EPIFA-C (P12ABFFF) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Έκφραση της ΜΜΡ-3 σε υπερκείμενα AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Η. pylori*. Η έκφραση της πρωτεΐνης, στον εξωκυττάριο χώρο, καθορίστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, 24 ώρες μετά την μόλυνση με α-MMP-3 και a-GAPDH.

3.2.3 Επίδραση της φωσφορυλίωσης σε θέσεις ΕΡΙΥΑ-C της πρωτεΐνης CagA, στην ενζυμική δραστηριότητα της MMP-3 στα υπερκείμενα AGS κυττάρων.

Για να μελετήσουμε την επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C, στην ενζυματική δραστηριότητα της εκκριθείσας MMP-3 χρησιμοποιήσαμε ζυμογράμματα καζεΐνης, με χρήση ολικής πρωτεΐνης από υπερκείμενα μολυσμένων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με τα στελέχη Η. pylori P12ABCCC και P12ABFFF. Παρατηρήθηκε ενζυματική καζεϊνολυτική δραστηριότητα στα 57 kDa, συμβατή με παρουσία MMP-3, μόνο στο υπερκείμενο κυττάρων που είχαν μολυνθεί με το στέλεχος P12ABCCC που περιέχει λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C της πρωτεΐνης CagA (Εικόνα 17). Αντίθετα, για το στέλεχος P12ABFFF που εκφράζει CagA με μη θέσεις φωσφορυλιώσιμες EPIFA-C νзδ ανιχνεύεται ενζυματική δραστηριότητα. Επιπλέον, καζεϊνολυτική δραστηριότητα συμβατή Jμ παρουσία MMP-7 στα 21 kDa, παρατηρήθηκε μόνο στα μολυσμένα κύτταρα με στελέχη που έχουν ΕΡΙΥΑ-C θέσεις φωσφορυλίωσης (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Ζυμόγραμμα καζεΐνης όπου παρατηρείται δράση της MMP-3 στα 57 kDa και δράση της MMP-7 στα 21 kDa.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βαρύτητα στην ιστοπαθολογική αλλοίωση και η κλινική έκφανση της λοίμωξης από H. pylori στους ασθενείς, φαίνεται ότι εξαρτάται αφενός από βακτηριακής προέλευσης παράγοντες παθογένειας, αφετέρου δε και από τη γενετική ποικιλομορφία του γονιδιώματος του ξενιστή (24). Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το κάπνισμα και η διατροφή με αυξημένη περιεκτικότητα σε αλάτι, συμβάλλουν στη αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση γαστρικού καρκίνου (7). Το *Η. pylori* επάγει την δημιουργία χρόνιας ενεργού γαστρικής φλεγμονής μέσω της ενεργοποίησης ενός μεγάλου αριθμού κυτταροκινών και χυμειοκινών που καθοδηγούν την εγκατάσταση της φλεγμονής στο γαστρικό επιθήλιο (26). Η πρωτεΐνη CagA του H. pylori, έχει δειχθεί ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στη παθογένεια του βακτηρίου με την εμπλοκή της σε ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μονοπατιών του γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου (5). Δεδομένου δε, ότι τα περισσότερα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη καρκίνου, κάτω από τις συνθήκες παραμένουσας H. pylori λοίμωξης, η πρωτεΐνη CagA, μπορεί να θεωρηθεί ότι λειτουργεί σαν μία ογκοπρωτεΐνη βακτηριακής προελεύσεως (45). Αποτέλεσμα της δράσης της CagA, είναι η απορύθμιση βασικών λειτουργιών των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, όπως η ικανότητα εντονότερου πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, αλλά και η διαταραχή της συνέχειας του γαστρικού επιθηλίου, προς όφελος της εγκατάστασης της λοίμωξης, μέσω της καταστροφής των διακυτταρικών συνδέσμων και της κυτταρικής πολικότητας, με επακόλουθο την αυξημένη κινητικότητα και κυτταρική διασπορά (5). Διαδικασίες λύσης της επιθηλιακής συνοχής προϋποθέτουν και την ενεργοποίηση μορίων που ενέχονται στην τροποποίηση βασικών δομών του εξωκυττάριου χώρου, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του ιστού (83). Στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίπτωσης της πρωτεΐνης CagA του H. pylori, μεταλλοπρωτεϊνασών του ιστού, και στην επαγωγή ιδιαίτερα της στρωμελυσίνης-1 (ΜΜΡ-3). Η εν λόγω μεταλλοπρωτεϊνάση του ιστού

80

επιλέχθηκε διότι έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τις προ-μορφές αρκετών μεταλλοπρωτεϊνασών (106), όπως την MMP-9 (120), την MMP-7 (121), την MMP-1 (122) και την MMP-13 (123). Όλες οι παραπάνω MMP, έχουν δειχθεί να συσχετίζονται με τη *Η. pylori* λοίμωξη και μάλιστα η δράση κάποιων από αυτές έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA (120). Επιπλέον, η στρωμελυσίνη-2 (MMP-10), η οποία εμφανίζει εξαιρετική ομολογία (82%) με τη στρωμελυσίνη-1 και έχει χαρακτηριστεί ως ισοένζυμό της (106), χρησιμοποιείται ως προγνωστικός καρκινικός δείκτης για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου (125).

Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλομορφία των κλινικών στελεχών, αναγκαστήκαμε να κατασκευάσαμε ισογενή γονιδιακά στελέχη H. pylori, βασιζόμενοι στο στέλεχος αναφοράς P12, τα οποία εκφράζουν τη πρωτεΐνη CagA είτε με μεταβαλλόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης EPIYA-C (P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) είτε με αντίστοιχες μη-φωσφορυλιωμένες θέσεις EPIFA-C (P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF), διατηρώντας σταθερά τα ΕΡΙΥΑ-Β μοτίβα. Αρχικά, ΕΡΙΥΑ-Α και εξετάσαμε προσεκτικά, тα μεταλλαγμένα στελέχη του H. pylori αναφορικά με το ρυθμό ανάπτυξής τους, το ρυθμό προσκόλλησής τους στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, τις πολικές επιδράσεις τους με άλλα γονίδια του cagPAI, το σχηματισμό της συζευκτικής πύλης, τη λειτουργικότητα του εκκριτικού συστήματος μεταφοράς τύπου ΙV, καθώς και την έκφραση και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA (126).

Συγκρίνοντας τα μεταλλαγμένα στελέχη με το γονικό στέλεχος P12, δείχθηκε επιτυχώς ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν την ίδια ικανότητα ανάπτυξης και προσκόλλησης στην επιφάνεια των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης, απεδείχθη ότι περιείχαν λειτουργικό γονίδιο *cagA* αλλά και λειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV, μια και εμφάνισαν όλα την ικανότητα να μεταφέρουν την πρωτεΐνη CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, καταδείχθηκε επιτυχής ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση τυροσίνης της πρωτεΐνης CagA με τις επακόλουθες φαινοτυπικές επιπτώσεις, όπως η κυτταρική επιμήκυνση και διασπορά. Όσον αφορά τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA, τα αποτελέσματά συμφωνούν με την αποδεκτή άποψη ότι η επαγωγή του κυτταρικού φαινοτύπου διασποράς προϋποθέτει τη φωσφορυλίωση των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C και είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C (76).

Αναφορικά με τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ΜΜΡ-3 παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας παρουσία έκφρασης της Πρωτεΐνης CagA και ευθέως ανάλογης προς τον αριθμό των ΕΡΙΥΑ-C θέσεων φωσφορυλίωσης. Καταρχήν, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή MMP3 στα αμόλυντα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά μόνο μετά από H. pylori μόλυνση. Στελέχη με τρεις ΕΡΙΥΑ-C θέσεις (Ρ12ΑΒCCC) και δύο θέσεις (P12ABCC) δείχθηκαν ότι επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση της MMP-3, 100 φορές και 50 φορές αντίστοιχα, περισσότερο από στελέχη Ρ12ΑΒ που δεν έχουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C, αλλά και από τα στελέχη P12ABC τα οποία έχουν μόνο μια θέση φωσφορυλίωσης EPIYA-C. Αντίθετα, στελέχη στα οποία υπήρχε αδυναμία φωσφορυλίωσης της CagA στις αντίστοιχες θέσεις λόγω αντικατάστασης των καταλοίπων τυροσίνης με φαινυλαλανίνη όπως στα P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF παρατηρήθηκε πολύ χαμηλή ενεργοποίηση της ΜΜΡ-3. Ανάλογη χαμηλή ενεργοποίηση της MMP-3 παρατηρήθηκε και για τα στελέχη στα οποία είχε απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη CagA (P12CagAKO) ή το λειτουργικό σύστημα μεταφοράς της στα κύτταρα (P12CagEKO). Τα παραπάνω αποτελέσματα για τη μεταγραφική ενεργοποίηση της ΜΜΡ-3 έρχονται σε συμφωνία με αυτά που αφορούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση της IL-8 καθώς και γι' αυτό το μόριο έχουν παρατηρηθεί ανάλογα αποτελέσματα, όπου η επαγωγή του γονιδίου είναι εξαρτώμενη από τη παρουσία της πρωτεΐνης CagA και ανάλογη του αριθμού των θέσεων φωσφορυλίωσης της ΕΡΙΥΑ-C (37).

Προσδιορίστηκε η έκφραση της MMP-3 σε πρωτεϊνικό επίπεδο με ανίχνευση κατά Western σε ολικά κυτταρολύματα κυττάρων που έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Καταρχήν, δεν παρατηρήθηκε έκφραση MMP3 στα αμόλυντα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά μόνο μετά από *H. pylori* μόλυνση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εν δυνάμει, η πρωτεΐνη CagA ενέχεται στην έκφραση της MMP-3 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς όλα τα CagA-θετικά στελέχη φάνηκε να επάγουν την έκφραση της MMP-3, ανεξάρτητα από

τον αριθμό ή την λειτουργικότητα των θέσεων φωσφορυλίωσης. Στελέχη τα οποία είτε δεν εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA (P12CagAKO) ή δεν την μετέφεραν στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων (P12CagEKO), δεν φανήκαν να επάγουν επιτυχώς την έκφραση της MMP-3. Για να διαπιστώσουμε αν η CagA είχε επίπτωση και στον μηχανισμό απελευθέρωσης ΜΜΡ-3 από τα επιθηλιακά κύτταρα προσδιορίστηκε επίσης, η έκφραση της MMP-3, με ανίχνευση κατά Western και στα υπερκείμενα των κυττάρων μετά από πειραματική μόλυνση με τα βακτηριακά στελέχη. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι αφενός, δεν φαίνεται να υπάρχει απελευθέρωση ΜΜΡ-3 από επιθηλιακά μη μολυσμένων κυττάρων. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα ΜΜΡ-3 παρατηρήθηκαν στα υπερκείμενα επιθηλιακών κυττάρων που είχαν υποστεί πειραματική μόλυνση με τα στελέχη που είτε δεν εκφράζουν την CagA πρωτεΐνη (P12CagAKO), ή δεν επάγουν το λειτουργικό σύστημα μεταφοράς τύπου IV (P12CagEKO). Πολύ υψηλότερη έκφραση MMP-3 παρατηρήθηκε στα υπερκείμενα κυττάρων που μολύνθηκαν με CagA-θετικά στελέχη, ανεξάρτητα από τον αριθμό των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C της πρωτεΐνης CagA. Αντίθετα πολύ χαμηλότερη έκφραση MMP-3 παρατηρήθηκε στα υπερκείμενα κυττάρων που μολύνθηκαν με CagA-θετικά στελέχη που περιείχαν μη φωσφορυλιώσιμες θέσεις EPIFA-C (P12ABFFF). Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C, στην ενζυμική δραστηριότητα της εκκριθείσας MMP-3. Παρατηρήθηκε ενζυμική καζεϊνολυτική δραστηριότητα συμβατή με παρουσία MMP-3, μόνο στο υπερκείμενο κυττάρων που είχαν μολυνθεί με το στέλεχος P12ABCCC που περιέχει λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης EPIYA-C της πρωτεΐνης CagA. Αντίθετα, για το στέλεχος P12ABFFF που εκφράζει CagA με φωσφορυλιώσιμες θέσεις EPIFA-C μŋ δεν ανιχνεύεται ενζυμική δραστηριότητα. Επιπλέον, καζεϊνολυτική δραστηριότητα συμβατή με παρουσία MMP-7, παρατηρήθηκε μόνο στα μολυσμένα κύτταρα με στελέχη που έχουν ΕΡΙΥΑ-C θέσεις φωσφορυλίωσης.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η έκφραση της MMP-3, είτε στα ολικά κυτταρολύματα είτε στα υπερκείμενα των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων με τα στελέχη του *Η. pylori*, εξαρτάται από την ύπαρξη της πρωτεΐνης CagA. Οι μέχρι τώρα δημοσιεύσεις, συσχετίζουν τη λοίμωξη του *Η. pylori* με την επαγωγή της

83

MMP-3 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (117, 118). Αυτό που συνάγεται από τα δικά μας αποτελέσματα, ήταν η ύπαρξη της πρωτεΐνης CagA επάγει σε υψηλότερα επίπεδα την έκφραση της MMP-3, από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στην *Η. pylori* λοίμωξη. Αντίθετα, από τα αποτελέσματα στα υπερκείμενα των καλλιεργειών, συνάγεται ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA στις θέσεις EPIYA-C πιθανώς να σχετίζεται με μηχανισμούς απελευθέρωσης ή και ενεργοποίησης της προ-μορφής MMP-3, καθώς παρατηρήθηκε ελαττωμένη έκφραση της MMP-3 και μηδενική ενζυμική δραστηριότητα στα υπερκείμενα κυττάρων μολυσμένων με στελέχη που εξέφραζαν την πρωτεΐνη CagA με μη-φωσφορυλιώσιμες θέσεις EPIFA-C. Ενδεχομένως, η πρωτεΐνη CagA να επιδρά στα πρώιμα στάδια ενεργοποίησης της MMP-3 ανεξάρτητα από τη φωσφορυλίωση της, αλλά από εκεί και πέρα η απελευθέρωσή της από το κύτταρο στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση στις θέσεις EPIYA-C.

Αναφορικά με την γενικότερη επίπτωση της CagA στην ενεργοποίηση MMP, εχει παρατηρηθεί ότι μετά από επιμόλυνση AGS κυττάρων με H. pylori, έχει διαπιστωθεί η ενεργοποίηση της MMP-1 η οποία έχει δειχθεί ότι επάγεται σε περιστατικά πεπτικού έλκους (132). Η ΜΜΡ-1 προκαλεί λύση στα υποστρώματα κολλαγόνου τύπου Ι και ΙΙΙ, τα οποία υπάρχουν στο γαστρικό επιθήλιο, πράγμα το οποίο εξηγεί εν μέρει έναν από τους μηχανισμούς καταστροφής του γαστρικού στρώματος που επάγεται μετά την H. pylori λοίμωξη. Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι η επαγωγή της ΜΜΡ-1 εξαρτάται από την πρωτεΐνη CaqA, είτε είναι φωσφορυλιωμένη είτε όχι, μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης των ERK (Extracellular signal-regulated kinases) και JNK (Jun amino-terminal kinases) (122, 132). Emim λ έον, έχει παρατηρηθεί εξάρτηση της επαγωγής των MMP-2 και MMP-9, από την ύπαρξη του cagPAI, καθώς και από την ύπαρξη της CagA. Στελέχη τα οποία δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη CagA δεν επήγαγαν την έκφραση των MMP-9 και MMP-2 (124). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η επαγωγή της ΜΜΡ-9 εξαρτάται και από τις θέσεις φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ-C της πρωτεΐνης CagA μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης του NF-κB (120, 124, 133). Συνολικά, τα αποτελέσματα μας παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και συνηγορούν για περαιτέρω μελέτη, καθώς υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές παραπομπές που υποστηρίζουν

την εξάρτηση της έκφρασης MMP-3 από τη CagA (124), καθώς και τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο αυτή επιτυγχάνεται.

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

AP-1	Early response transcription factor Activating Protein-1
BabA	Blood group antigen-binding adhesin
BHIB	Brean Heart Infusion Broth
CagA	Cytotoxin-associated gene A
cagPAI	cag Pathogenicity Island
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester
CFU/ml	Colony Forming Units/ml
CRK	Adapter molecule chicken tumour virus no. 10 [CT10] regulator of kinase
c-SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC(Rous Sarcoma)
dNTP	Deoxyriconucleotide triphosphate
DupA	Duodenal ulcer promoting gene A
ECL	Enhanced Chemiluminescense
EDTA	2,2',2"',2"'-(Ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPIYA	Glutamic acid-Proline-Isoleukine-Tyrosine-Alanine(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)
EPIYA-A	KKELNEKFKNFNNNNNGLKN(ST) <u>EPIYA</u> KVNKKK
EPIYA-B	(A/T/V/S)CQ(V/A)ASP <u>EPI(A/T)(</u> Q/K)VAKKVNAKIDRLNQIASGLGGVGQAAG

EPIYA-C	FPLKRHDKVDDLSKVG(R/L)S(V/A)SP <i>EPIYA</i> TIDDLGGP
EPIYA-D	AINRKIDRINKIASSAGKGVGGFSGAGRSASP EPIYA TIDFDEANQAG
ERK/MAPK	Extracellular signal-Regulated Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GRB2	Growth-factor Receptor Bound protein 2
Hp, H. pylori	Helicobacter pylori
HRP	Horseradish Peroxidase
Hummingbird Phenotype	Φαινότυπος Διασποράς
IP	Immunoprecipitation
JNK	c-Jun N-terminal kinase
ΜΟΙ	Multiplicity of Infection
Na ₃ VO ₄	Sodium Orthovanadate
NF-κB	Nuclear Factor κ B
OD	Optical Density
OipA	Outer inflammatory protein
PAR1/MARK	Partitioning defective 1/ Microtubule Affinity-regulating kinase
PBS	Phosphate Buffer Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride (IUPAC: poly-1,1-difluoroethene)
pΥ	Phospho-Tyrosine
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rho GTPase)
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma serine/ threonine-specific protein kinase
PYK2	Proline-rich tyrosine kinase 2
RAS	Rat Sarcoma membrane associated GTPase
RGD	Arg-Gly-Asp
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SabA	Sialic acid-binding adhesin
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SHP-2	SRC homology2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphate 2
T4SS	Type IV Secretion System
TBE	Tris/Borate/EDTA buffer
TBS-T	Tris Buffer Saline/Tween 20
VacA	Vacuolating cytotoxin A
WB	Western Blotting
ZO-1	Zonula Occludens

Αναφορές

1. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. *Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk*. Clinical microbiology reviews. **2010** Oct;23(4):713-39.

2. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. *Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases*. Nature reviews Drug discovery. **2007** Jun;6(6):480-98.

3. Amieva MR, El-Omar EM. *Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection*. Gastroenterology. **2008** Jan;134(1):306-23.

4. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host.* Nature reviews Microbiology. **2007** Jun;5(6):441-52.

5. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. *The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis*. Helicobacter. **2010** Jun;15(3):163-76.

6. Bourzac KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion*. Cellular microbiology. **2005** Jul;7(7):911-9.

7. Polk DB, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond*. Nature reviews Cancer. **2010** Jun;10(6):403-14.

8. Marshall BJ, Warren JR. *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet. **1984** Jun 16;1(8390):1311-5.

9. Bizzozero G. Sulle ghiandole tubulari del tubo gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epitelio de rivestimento della mucosa. Atti R Accad Sci. **1893**;28:233-51.

10. Krienitz U. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Dtsch Med Wochenschr. **1906**;32 872.

11. Steer HW. Ultrastructure of cell migration throught the gastric epithelium and its relationship to bacteria. Journal of clinical pathology. **1975** Aug;28(8):639-46.

12. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 <u>http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/</u>.

13. Solnick JV, Franceschi F, Roccarina D, Gasbarrini A. *Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection--other Helicobacter species*. Helicobacter. **2006** Oct;11 Suppl 1:46-51.

14. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, et al. *Rapid and specific detection of Helicobacter pylori macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation*. Gut. **2000** May;46(5):608-14.

15. Saito N, Konishi K, Sato F, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, et al. *Plural transformation-processes from spiral to coccoid Helicobacter pylori and its viability*. The Journal of infection. **2003** Jan;46(1):49-55.

16. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ. *Coccoid* form of Helicobacter pylori as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. Applied and environmental microbiology. **2007** May;73(10):3423-7.

17. Chu YT, Wang YH, Wu JJ, Lei HY. *Invasion and multiplication of Helicobacter pylori in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance*. Infection and immunity. **2010** Oct;78(10):4157-65.

18. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Traini T, et al. *Characterization of an Helicobacter pylori environmental strain*. Journal of applied microbiology. **2008** Sep;105(3):761-9.

19. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. *Effect of chlorine on incorporation of Helicobacter pylori into drinking water biofilms*. Applied and environmental microbiology. **2010** Mar;76(5):1669-73.

20. Quaglia NC, Dambrosio A, Normanno G, Parisi A, Patrono R, Ranieri G, et al. *High occurrence of Helicobacter pylori in raw goat, sheep and cow milk inferred by glmM gene: a risk of food-borne infection?* International journal of food microbiology. **2008** May 10;124(1):43-7.

21. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. *A H*+-*gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization*. Science. **2000** Jan 21;287(5452):482-5.

22. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. *Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature. **1999** Jan 14;397(6715):176-80.

23. Atherton JC, Blaser MJ. *Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications*. The Journal of clinical investigation. **2009** Sep;119(9):2475-87.

24. Yamaoka Y. *Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. **2010** Nov;7(11):629-41.

25. Backert S, Clyne M. *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. **2011** Sep;16 Suppl 1:19-25.

26. Atherton JC. *The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases*. Annual review of pathology. **2006**;1:63-96.

27. Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. *Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity*. Infection and immunity. **1990** Mar;58(3):603-10.

28. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. *Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis.* The lancet oncology. **2012** Jun;13(6):607-15.

29. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Megraud F. *Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. **2012** Sep;17 Suppl 1:1-8.

30. Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. *Age-specific incidence of Helicobacter pylori*. Gastroenterology. **2006** Jan;130(1):65-72; quiz 211.

31. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, et al. *Age at acquisition of Helicobacter pylori infection: a follow-up study from infancy to adulthood*. Lancet. **2002** Mar 16;359(9310):931-5.

32. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, et al. *Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health*. Clinical microbiology reviews. **2009** Apr;22(2):202-23, Table of Contents.

33. Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori: a poor man's gut pathogen?* Gut pathogens. **2010**;2(1):2.

34. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, et al. *Horizontal versus familial transmission of Helicobacter pylori*. PLoS pathogens. **2008** Oct;4(10):e1000180.

35. Delport W, Cunningham M, Olivier B, Preisig O, van der Merwe SW. *A population genetics pedigree perspective on the transmission of Helicobacter pylori*. Genetics. **2006** Dec;174(4):2107-18.

36. Raymond J, Thiberge JM, Kalach N, Bergeret M, Dupont C, Labigne A, et al. *Using macro-arrays to study routes of infection of Helicobacter pylori in three families*. PloS one. **2008**;3(5):e2259.

37. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Hatziloukas E, Sgouras DN. *Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in Helicobacter pylori CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats*. PloS one. **2013**;8(2):e56291.

38. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer*. The New England journal of medicine. **2001** Sep 13;345(11):784-9.

39. Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, et al. *Helicobacter* pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a

randomized controlled trial. JAMA : the journal of the American Medical Association. **2004** Jan 14;291(2):187-94.

40. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC, et al. *Long term follow up of patients treated for Helicobacter pylori infection*. Gut. **2005** Nov;54(11):1536-40.

41. Nozaki K, Shimizu N, Inada K, Tsukamoto T, Inoue M, Kumagai T, et al. *Synergistic promoting effects of Helicobacter pylori infection and high-salt diet on gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils*. Japanese journal of cancer research : Gann. **2002** Oct;93(10):1083-9.

42. Romero-Gallo J, Harris EJ, Krishna U, Washington MK, Perez-Perez GI, Peek RM, Jr. *Effect of Helicobacter pylori eradication on gastric carcinogenesis*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. **2008** Mar;88(3):328-36.

43. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002.* CA: a cancer journal for clinicians. **2005** Mar-Apr;55(2):74-108.

44. Correa P. Is gastric cancer preventable? Gut. 2004 Sep;53(9):1217-9.

45. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. Nature reviews Cancer. **2004** Sep;4(9):688-94.

46. Correa P, Houghton J. *Carcinogenesis of Helicobacter pylori*. Gastroenterology. **2007** Aug;133(2):659-72.

47. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality*. Nature reviews Microbiology. **2005** Apr;3(4):320-32.

48. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, et al. *Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA*. The Journal of experimental medicine. **1998** Jan 5;187(1):135-40.

49. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, et al. *Functional antagonism between Helicobacter pylori CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2005** Jul 5;102(27):9661-6.

50. Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, Brenner L, Backert S, Kusters JG, et al. *Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastric inflammation*. Gut. **2006** Sep;55(9):1360-1; author reply 1.

51. Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, et al. *Epithelial attachment alters the outcome of Helicobacter pylori infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1998** Mar 31;95(7):3925-30.

52. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, et al. *Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease*. Gut. **2006** Jun;55(6):775-81.

53. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. *Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation*. Science. **2002** Jul 26;297(5581):573-8.

54. Marcos NT, Magalhaes A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, Mendes N, et al. *Helicobacter pylori induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x*. The Journal of clinical investigation. **2008** Jun;118(6):2325-36.

55. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. *A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2000** Jun 20;97(13):7533-8.

56. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, et al. *Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors*. Cancer research. **2008** Jan 15;68(2):379-87.

57. Yamaoka Y, Kudo T, Lu H, Casola A, Brasier AR, Graham DY. *Role of interferonstimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in Helicobacter pylori infection*. Gastroenterology. **2004** Apr;126(4):1030-43.

58. Wu JY, Lu H, Sun Y, Graham DY, Cheung HS, Yamaoka Y. *Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates Helicobacter pylori-stimulated matrix metalloproteinase 1 expression*. Cancer research. **2006** May 15;66(10):5111-20.

59. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. *Duodenal ulcer promoting gene of Helicobacter pylori*. Gastroenterology. **2005** Apr;128(4):833-48.

60. Geis G, Leying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W. *Ultrastructure and chemical analysis of Campylobacter pylori flagella*. Journal of clinical microbiology. **1989** Mar;27(3):436-41.

61. O'Toole PW, Kostrzynska M, Trust TJ. *Non-motile mutants of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae defective in flagellar hook production*. Molecular microbiology. **1994** Nov;14(4):691-703.

62. Leying H, Suerbaum S, Geis G, Haas R. *Cloning and genetic characterization of a Helicobacter pylori flagellin gene*. Molecular microbiology. **1992** Oct;6(19):2863-74.

63. Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. *Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange*. Journal of bacteriology. **1993** Jun;175(11):3278-88.

64. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. *Comparative ultrastructural and functional studies of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in Helicobacter species*. Journal of bacteriology. **1995** Jun;177(11):3010-20.

65. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. *Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes*. Infection and immunity. **1996** Jul;64(7):2445-8.

66. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. *Molecular cloning and characterization of the Helicobacter pylori fliD gene, an essential factor in flagellar structure and motility.* Journal of bacteriology. **1999** Nov;181(22):6969-76.

67. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. Nature immunology. **2004** Nov;5(11):1166-74.

68. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer research. **1995** May 15;55(10):2111-5.

69. Backert S, Fronzes R, Waksman G. *VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems?* Trends in microbiology. **2008** Sep;16(9):409-13.

70. Tegtmeyer N, Backert S. *Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the Helicobacter pylori CagA protein*. European journal of cell biology. **2011** Nov;90(11):880-90.

71. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. *Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1999** Dec 7;96(25):14559-64.

72. Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, et al. *Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells*. The Journal of experimental medicine. **2000** Feb 21;191(4):593-602.

73. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. *Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion*. Science. **2000** Feb 25;287(5457):1497-500.

74. Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF. *Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells*. Molecular microbiology. **2001** Nov;42(3):631-44.

75. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA*. Science. **2003** May 30;300(5624):1430-4.

76. Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt S, Yamaoka Y, De Poire E, Sgouras D, et al. *c*-Src and *c*-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian Helicobacter pylori strains. The Journal of clinical investigation. **2012** Apr 2;122(4):1553-66.

77. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. *Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries.* Journal of clinical microbiology. **1999** Jul;37(7):2274-9.

78. Atherton JC, Cover TL, Twells RJ, Morales MR, Hawkey CJ, Blaser MJ. *Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori*. Journal of clinical microbiology. **1999** Sep;37(9):2979-82.

79. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, et al. *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein*. Science. **2002** Jan 25;295(5555):683-6.

80. Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. *Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities*. Molecular cell. **2002** Oct;10(4):745-55.

81. Hatakeyama M. *SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis*. Current opinion in microbiology. **2008** Feb;11(1):30-7.

82. Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. *Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in Helicobacter pylori pathogenesis*. The FEBS journal. **2011** Apr;278(8):1190-202.

83. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell. **2010** Apr 2;141(1):52-67.

84. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH. *Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders*. The British journal of ophthalmology. **2000** Jun;84(6):654-66.

85. Sivak JM, Fini ME. *MMP in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology*. Progress in retinal and eye research. **2002** Jan;21(1):1-14.

86. Liesi P, Narvanen A, Soos J, Sariola H, Snounou G. *Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides*. FEBS letters. **1989** Feb 13;244(1):141-8.

87. Libby RT, Brunken WJ, Hunter DD. *Roles of the extracellular matrix in retinal development and maintenance*. Results and problems in cell differentiation. **2000**;31:115-40.

88. Baron-Van Evercooren A, Kleinman HK, Ohno S, Marangos P, Schwartz JP, Dubois-Dalcq ME. *Nerve growth factor, laminin, and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures*. Journal of neuroscience research. **1982**;8(2-3):179-93.

89. Chintala SK. *The emerging role of proteases in retinal ganglion cell death*. Experimental eye research. **2006** Jan;82(1):5-12.

90. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*. Nature reviews Immunology. **2004** Aug;4(8):617-29.

91. Zhang Y, Lin JX, Vilcek J. Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. The Journal of biological chemistry. **1988** May 5;263(13):6177-82.

92. Edwards DR, Rocheleau H, Sharma RR, Wills AJ, Cowie A, Hassell JA, et al. *Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription*. Biochimica et biophysica acta. **1992** Nov 15;1171(1):41-55.

93. White LA, Brinckerhoff CE. Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, *c-Fos, and Fra-2*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. **1995** Dec;14(9):715-25.

94. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. *Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases*. Best practice & research Clinical rheumatology. **2001** Dec;15(5):805-29.

95. Murphy G. *The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors*. Agents and actions Supplements. **1991**;35:69-76.

96. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. *Matrix metalloproteinases and oral cancer*. Oral oncology. **1999** May;35(3):227-33.

97. Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Liotta LA. *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family.* The Journal of biological chemistry. **1989** Oct 15;264(29):17374-8.

98. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. *The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family*. The Journal of biological chemistry. **1995** Jun 16;270(24):14313-8.

98

99. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4*. The Journal of biological chemistry. **1996** Nov 29;271(48):30375-80.

100. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. *The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3*. The Journal of biological chemistry. **1996** Jul 19;271(29):17119-23.

101. Visse R, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circulation research. **2003** May 2;92(8):827-39.

102. Nagase H. *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biological chemistry. **1997** Mar-Apr;378(3-4):151-60.

103. Itoh Y, Nagase H. *Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase.* The Journal of biological chemistry. **1995** Jul 14;270(28):16518-21.

104. Nagase H, Visse R, Murphy G. *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovascular research. **2006** Feb 15;69(3):562-73. 105. Nagase H, Woessner JF, Jr. *Matrix metalloproteinases*. The Journal of biological chemistry. **1999** Jul 30;274(31):21491-4.

106. Nagase H. Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rdEdn. 2012.

107. Sapolsky AI, Howell DS, Woessner JF, Jr. *Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage*. The Journal of clinical investigation. **1974** Apr;53(4):1044-53.

108. Werb Z, Reynolds JJ. *Stimulation by endocytosis of the secretion of collagenase and neutral proteinase from rabbit synovial fibroblasts*. The Journal of experimental medicine. **1974** Dec 1;140(6):1482-97.

109. Galloway WA, Murphy G, Sandy JD, Gavrilovic J, Cawston TE, Reynolds JJ. *Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components*. The Biochemical journal. **1983** Mar 1;209(3):741-52.

110. Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. The Journal of biological chemistry. **1985** Oct 5;260(22):12367-76.

111. Okada Y, Nagase H, Harris ED, Jr. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification

and characterization. The Journal of biological chemistry. **1986** Oct 25;261(30):14245-55.

112. Vater CA, Nagase H, Harris ED, Jr. *Purification of an endogenous activator of procollagenase from rabbit synovial fibroblast culture medium*. The Journal of biological chemistry. **1983** Aug 10;258(15):9374-82.

113. Formstone CJ, Byrd PJ, Ambrose HJ, Riley JH, Hernandez D, McConville CM, et al. *The order and orientation of a cluster of metalloproteinase genes, stromelysin 2, collagenase, and stromelysin, together with D11S385, on chromosome 11q22-q23.* Genomics. **1993** Apr;16(1):289-91.

114. Nagase H. Chapter 158 - Matrix Metalloproteinase 3/Stromelysin 1. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press; 2013; p. 763-74.

115. Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, et al. *The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis*. Cell. **1999** Jul 23;98(2):137-46.

116. Peek RM, Jr., Crabtree JE. *Helicobacter infection and gastric neoplasia*. The Journal of pathology. **2006** Jan;208(2):233-48.

117. Gooz M, Gooz P, Smolka AJ. *Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in H. pylori infection of human gastric cells*. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. **2001** Sep;281(3):G823-32.

118. Gooz M, Shaker M, Gooz P, Smolka AJ. Interleukin 1beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during Helicobacter pylori infection. Gut. **2003** Sep;52(9):1250-6.

119. Yeh YC, Sheu BS, Cheng HC, Wang YL, Yang HB, Wu JJ. *Elevated serum matrix metalloproteinase-3 and -7 in H. pylori-related gastric cancer can be biomarkers correlating with a poor survival*. Digestive diseases and sciences. **2010** Jun;55(6):1649-57.

120. Nam YH, Ryu E, Lee D, Shim HJ, Lee YC, Lee ST. *CagA phosphorylationdependent MMP-9 expression in gastric epithelial cells*. Helicobacter. **2011** Aug;16(4):276-83.

121. Chung WC, Jung SH, Lee KM, Paik CN, Kawk JW, Jung JH, et al. *The detection of Helicobacter pylori cag pathogenicity islands (PAIs) and expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in gastric epithelial dysplasia and intramucosal cancer.* Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association. **2010** Aug;13(3):162-9.

122. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Lee YC, Scher JU, Roper J, et al. Helicobacter pylori stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA- *dependent and -independent ERK activation*. The Journal of biological chemistry. **2007** Jun 29;282(26):18722-31.

123. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Scher JU, Izmirly P, Tolani S, et al. *Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by E prostaglandins and MAPKs*. The Journal of biological chemistry. **2005** Mar 18;280(11):9973-9.

124. Kundu P, Mukhopadhyay AK, Patra R, Banerjee A, Berg DE, Swarnakar S. *Cag pathogenicity island-independent up-regulation of matrix metalloproteinases-9 and -2 secretion and expression in mice by Helicobacter pylori infection*. The Journal of biological chemistry. **2006** Nov 10;281(45):34651-62.

125. Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Yoshida K, Noguchi T, et al. *Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer.* Oncogene. **2006** Apr 20;25(17):2546-57.

126. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN. *A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the cagA Gene of Helicobacter pylori*. Helicobacter. **2012** Nov 27.

127. van Vliet AH, Wooldridge KG, Ketley JM. *Iron-responsive gene regulation in a campylobacter jejuni fur mutant*. Journal of bacteriology. **1998** Oct;180(20):5291-8.

128. Lesouhaitier O, Chiappe A, Rossier MF. *Aldosterone increases T-type calcium currents in human adrenocarcinoma (H295R) cells by inducing channel expression*. Endocrinology. **2001** Oct;142(10):4320-30.

129. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry. **1985** Oct;150(1):76-85.

130. Daniel M. Bollag MDR, Stuart J. Edelstein. *Protein Methods*. (vol. Sons JW, ed. 2nd ed; **1996**.

131. Logan RP, Robins A, Turner GA, Cockayne A, Borriello SP, Hawkey CJ. *A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of Helicobacter pylori to gastric epithelial cells*. Journal of immunological methods. **1998** Apr 1;213(1):19-30.

132. Krueger S, Hundertmark T, Kalinski T, Peitz U, Wex T, Malfertheiner P, et al. *Helicobacter pylori encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK*. The Journal of biological chemistry. **2006** Feb 3;281(5):2868-75.

133. Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, et al. *Helicobacter pylori induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB*. Gastroenterology. **2003** Apr;124(4):983-92.