

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μετα-μεταγραφική ρύθμιση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στη λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*). Μελέτη έκφρασης microRNAs με μικροσυστοιχίες»





ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

επιβλεπούς

Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ Σγούρας Διονύσιος, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΕΙΠ

AOHNA 2019



ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ Δρ Σγούρας Διονύσιος

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ» Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μετα-μεταγραφική ρύθμιση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στη λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*). Μελέτη έκφρασης microRNAs με μικροσυστοιχίες»

ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΑΜ: 41615

επιβλεπούΣΑ

Κόλλια Παναγούλα,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ Σγούρας Διονύσιος,

Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρική Μικροβιολογίας, ΕΙΠ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ Αλεπόρου Βασιλική, Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής, ΕΚΠΑ Σγούρας Διονύσιος, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρική Μικροβιολογίας, ΕΙΠ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

<u>Εικόνες Εξωφύλλου</u>

(Αριστερά) Ηλεκτρονιογραφία σάρωσης (SEM) γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου καλλιέργειας με προσκολλημένα Η. pylori βακτήρια (κίτρινα) ύστερα από ψευδοχρωματισμό. [Kelleher 2000]

(Δεξιά) Ηλεκτρονιογραφία σάρωσης (SEM) του Helicobacter pylori (πορτακαλί) σε γαστρικό επιθηλιακό κύτταρο ιστοτεμαχίου ύστερα από ψευδοχρωματισμό. Διακρίνονται οι μικρολάχνες των επιθηλιακών κυττάρων και τα μαστίγια του βακτηρίου. [Max Planck Society 2015]

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ στα πλαίσια διεξαγωγής της Διπλωματικής μου εργασίας στον Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Υπεύθυνοι για την επίβλεψη της εργασίας αυτής ήταν ο κος Σγούρας Διονύσιος, Διευθυντής Ερευνών στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) και η κα Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Είναι αυτή η ομορφότερη στιγμή, όπου ένα τόσο μεγάλης έκτασης και σημασίας ερευνητικό έργο έφθασε στο τέλος του. Κοιτάζοντας πίσω, αναπολείς τα μονοπάτια από τα οποία πέρασες, με τις ομορφιές αλλά και τις δυσκολίες τους και καθώς αυτά ξεθωριάζουν σου μένουν στο νου μόνο τα πρόσωπα των ανθρώπων που ήταν εκεί μαζί σου, που σε στήριξαν και σε καθοδήγησαν. Έχοντας, λοιπόν, ολοκληρώσει τη συγγραφή της παρούσας εργασίας αισθάνομαι πραγματικά την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα κάποιους ανθρώπους που με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας.

Για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να ασχοληθώ με Ελικοβακτήριο του πυλωρού και παράλληλα με τα microRNAs, δύο μείζονος ενδιαφέροντος ερευνητικά πεδία, και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου ευχαριστώ θερμά την κα Παπασιδέρη Ισιδώρα, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας και Διευθύντρια του Διατμηματικού ΜΔΕ «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας & της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, και την κα Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Ευχαριστώ τον κο Μεντή Ανδρέα, Διευθυντή Ερευνών & Προϊστάμενο στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του ΕΙΠ για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξάγω την ερευνητική μου εργασία στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας και να γνωρίσω αυτόν τον πλούσιο κι εξελισσόμενο κλάδο της επιστήμης. Ευχαριστώ βαθύτατα τον υπεύθυνό μου στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του ΕΙΠ Δρ. Σγούρα Διονύσιο, για την ανάθεση του θέματος, που με μύησε στα επίκαιρα και φλέγοντα ζητήματα που αφορούν τον καρκινογόνο αυτό μικροοργανισμό, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ευχαριστώ πολύ τη Δρ. Σανούδου Δέσποινα, Επισκέπτρια Ερευνήτρια στο Εργαστήριο Μοριακή Βιολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και Επίκουρη Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την ευκαιρία που μου έδωσε να αναλύσω τα δεδομένα μου στο λογισμικό πρόγραμμα βιοπληροφορικής ανάλυσης "INGENUITY" που διαθέτει στο Εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης, τους Δρ. Καραμήτρο Τιμοκράτη για τις πάντα εύστοχες υποδείξεις και ιδιαιτέρως τη Δρ Beatriz Martinez-Gonzalez για την προσφορά των επιστημονικών της γνώσεων, τη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Για την υπομονή τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά για την καθοδήγησή τους ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου και φίλους, τους Υποψηφίους Διδάκτορες Καραγιάννη Ιωάννη και Κοντιζά Ελευθέριο και τη συμφοιτήτρια Καρτσιούκα Χρυσούλα, όπως επίσης, τις φίλες και συναδέλφους βιολόγους Βαλαντή Ευταξία, Υποψήφια Διδάκτορα στο ΙΙΒΕΑΑ και Τζωρτζάκη Κλεοπάτρα, συμφοιτήτρια ΜΔΕ στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ, για την πολύτιμη βοήθειά τους, αλλά και για τις ώρες που πάντα πρόθυμα μου αφιέρωναν συμβουλεύοντάς με στις προκύπτουσες δυσκολίες. Ευχαριστώ την Κουσκούνη Μαρία για την επιμέλεια της εκτύπωσης. Τέλος, ευχαριστώ πάνω από όλα την οικογένειά μου, τους γονείς μου Γαβριήλ και Γεωργία και τα αδέρφια μου Γιώργο, Μαρία, Νίκη και Ολυμπία, για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει αλλά και την υπομονή που έχουν επιδείξει όλα αυτά τα χρόνια, ώστε να μου προσφέρουν το αγαθό της γνώσης, χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν ανέφικτο να φθάσω μέχρι εδώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	9
Abstract	
Συντμήσεις	
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (Helicobacter pylori)	
1.1 Ιστορική αναδρομή	
1.2 Επιδημιολογία της <i>Η. pylori</i> λοίμωξης	
1.3 Μετάδοση, Διάγνωση & Θεραπεία της <i>Η. pylori</i> λοίμωξης	
1.4 Δομή & Γονιδίωμα του <i>Helicobacter pylori</i>	20
1.4.1 Η CagA ογκοπρωτεΐνη του <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.4.2 Η VacA πρωτεΐνη του <i>Helicobacter pylori</i>	26
1.4.3 Άλλοι λοιμοτοξικοί παράγοντες του <i>Helicobacter pylori</i>	28
1.5 Φυσική πορεία της <i>Η. pylori</i> λοίμωξης	29
1.6 Ανοσοαπόκριση έναντι της <i>Η. pylori</i> λοίμωξης & Ανοσοδιαφυγή	
1.7 Εκρίζωση του Helicobacter pylori	
2. Βιογένεση των microRNA (miRNA ή miR)	
2.1 Εισαγωγή	
2.2 Ονοματολογία των miRNA	40
2.3 Πυρηνική επεξεργασία των pri-miRNA	40
2.4 Κυτταροπλασματική επεξεργασία των pre-miRNA	41
3. Τα microRNA στην <i>Η. pylori</i> λοίμωξη	
3.1 Εισαγωγή	43
3.2 Ρύθμιση των microRNA στην <i>Η. pylori</i> λοίμωξη	
3.3 Εκρίζωση του <i>Η. pylori</i> & miRNA	52
Σκοπός της Εργασίας	53
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	57
4.1 Αρχή Μεθόδου	57
4.2 Τεχνικές	58
4.2.1 Χειρισμός βακτηριακών Helicobacter pylori στελεχών	58
4.2.1.1 Καλλιέργεια στελεχών Helicobacter pylori	58
4.2.1.2 Κρυο-συντήρηση στελεχών <i>Η. pylori</i>	58
4.2.1.3 Ταυτοποίηση <i>Η. pylori</i> με τη δοκιμασία ουρεάσης	
4.2.2 Χειρισμός της AGS κυτταρικής σειράς	
4.2.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς AGS	
4.2.2.2 Κρυο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	
4.2.2.3 Υπολογισμός αριθμού κυττάρων	59

4.2.2.4 Ανίχνευση ενδεχόμενης μόλυνσης από <i>Mycoplasma</i> με PCR	9
4.2.3 <i>In vitro</i> μόλυνση των AGS κυττάρων με <i>Helicobacter pylori</i> στελέχη60	0
4.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από AGS κύτταρα60	0
4.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης –	1
Επιβεβαίωση ακεραιότητας RNA62	1
4.3 Βιοπληροφορική Ανάλυση62	1
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	2
5.1 Αποτελέσματα από την ανάλυση των microarrays (AFFYMETRIX)62	2
5.2 Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής Ανάλυσης63	3
5.2.1 Επίδραση της λοίμωξης στην απορρύθμιση των miR (ABCC vs AGS)64 5.2.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της CagA στην απορρύθμιση των miR	4
(ABCC vs ABFF)	7
5.2.3 Επίδραση της CagA στην απορρύθμιση των miR (ABCC vs cagA-KO)	1
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ75	5
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ81	1
ПАРАРТНМА	
Παθολογοανατομικά στάδια γαστρικής εξαλλαγής82	7

Περίληψη

Η χρόνια λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori, Hp*) είναι ο βασικότερος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Ένας μείζων λοιμοτοξικός παράγοντας του *Hp* είναι η ογκοπρωτεΐνη CagA, της οποίας η βιολογική δραστικότητα προσδιορίζεται από τον αριθμό επαναλήψεων των ΕΡΙΥΑ (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) μοτίβων φωσφορυλίωσης τυροσίνης στο C-τελικό της άκρο. Μετά την είσοδό της στο επιθηλιακό κύτταροξενιστή, η CagA ασκεί ένα μεγάλο εύρος επιδράσεων στα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που εξαρτώνται ή όχι από τη φωσφορυλίωσή της. Τα microRNA (miRNA) αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς μετα-μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων-στόχων επηρεάζοντας πολλές βιολογικές διαδικασίες. Η απορρύθμιση της έκφρασής τους οδηγεί στη διατάραξη των βιολογικών διεργασιών που ελέγχουν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Τα miRNA που απορρυθμίζονται κατά την *Hp* λοίμωξη φαίνεται να εμπλέκονται στην επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT), ενώ αρκετά από αυτά συχνά παρουσιάζουν διαφορική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα, εκδηλώνοντας τις δράσεις τους είτε ως ογκογόνα είτε ως ογκοκατασταλτικά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των miRNA που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης με *Hp* στελέχη και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία αυτά εμπλέκονται. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίσθηκε με μικροσυστοιχίες η σχετική διαφορική έκφραση των miRNA της AGS κυτταρικής σειράς γαστρικού αδενοκαρκινώματος, στο επίπεδο διαφορικής έκφρασης |FoldChange|≥ 2 και στατιστικής σημαντικότητας p-value< 5%, στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης με ισογενή *H. pylori* P12 στελέχη που φέρουν την CagA πρωτεΐνη με δραστικότητα (ABCC) ή όχι (ABFF) κινάσης και που δε φέρουν την CagA (*cagA*-KO), ενώ AGS μημολυσμένα κύτταρα που υποβλήθηκαν στις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Εν συνεχεία, με βιοπληροφορική ανάλυση (DIANA, IPA, στο p-value< 5%) μελετήθηκαν τα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχουν καθώς και τα mRNA-στόχοι αυτών.

Από τα 990 miRNA που εξετάστηκαν, τα 27 βρέθηκαν με διαφορές στην έκφρασή τους συνολικά στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης (let-7f-1, miR-29a, miR-32, miR-181b-1, miR-192, miR-205, miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-371a, miR-371b, miR-372, miR-373, miR-378e, miR-548i-1, miR-3160-1, miR-3189, miR-3193, miR-3529, miR-4462, miR-4516, miR-4540, miR-4677, miR-4710, miR-4739 & miR-4783). Η έκφραση κάποιων εξ αυτών φαίνεται να εξαρτάται από την CagA ή/και από τη φωσφορυλίωσή της ή να μην εξαρτάται από αυτήν. Ενώ, φαίνεται να εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο και με τη σηματοδότηση από τις MAPK, GnRH και από οιστρογόνα. Επίσης, τα miRNA αυτά προέκυψε ότι συμμετέχουν σε μηχανισμούς που απορρυθμίζουν κυτταρικές διεργασίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τα πολύπλοκα δίκτυα αλληλεπιδράσεων στα οποία συμμετέχουν τα miRNAs που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση αλλά και το ρόλο τους στη ρύθμιση των κυτταρικών μηχανισμών που επηρεάζονται κατά την *Η. pylori* λοίμωξη, κυρίως των μονοπατιών που συσχετίζονται με τη γαστρική κυτταρική εξαλλαγή.

9

Abstract

Helicobacter pylori (*Hp*) chronic infection is the primary risk factor for developing gastric adenocarcinoma. A major *Hp* virulence factor is the CagA oncoprotein, whose biological activity is determined by the number of EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) tyrosine phosphorylation motifs that are present in its C-terminal region. Following its injection into host epithelial cells, CagA exerts a wide range of effects on intracellular signaling pathways, depending on its phosphorylation status. MicroRNAs (miRNAs) constitute one of the most important post-transcriptional regulating mechanisms therefore affecting many biological processes. The deregulation of miRNAs' expression leads to perturbation in the biological processes that they control, resulting in several pathological conditions. MiRNAs with variation in their expression patterns during *Hp* infection seem to be implicated in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), while many of them often display differential expression in cancer cells and function either as tumor promoters (oncomiR) or tumor suppressors.

The aim of the present study was to determine which miRNAs are differentially expressed in various *Hp* infection conditions, as well as the associated molecular pathways. For this purpose, the relative differential expression of miRNAs was defined in the AGS cell line of gastric adenocarcinoma using microarrays, in a |FoldChange| \geq 2 and p-value< 5% cutoff, in P12 isogenic *Hp* strains infected conditions in which the bacteria carried CagA protein with kinase activity (ABCC) or not (ABFF) and in *cagA*-knockout infected conditions (*cagA*-KO). AGS non-infected cells that undergo the same treatment constituted the negative control sample. Following this, the molecular signaling pathways were examined using bioinformatic analysis (DIANA, IPA, in p-value < 5%) for the differentially expressed miRNAs and their mRNA-targets.

Differential expression analysis revealed expression change in 27 out of a total of 990 miRNAs that were tested (let-7f-1, miR-29a, miR-32, miR-181b-1, miR-192, miR-205, miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-371a, miR-371b, miR-372, miR-373, miR-378e, miR-548i-1, miR-3160-1, miR-3189, miR-3193, miR-3529, miR-4462, miR-4516, miR-4540, miR-4677, miR-4710, miR-4739 & miR-4783). The expression of some of them appears to be CagA and/or phosphorylation -dependent or - independent. Additionally, altered miRNAs are involved in molecular pathways correlated with cancer and MAPK, GnRH and estrogen signaling pathways. Moreover, these miRNAs participate in mechanisms that deregulate cellular processes, such as cell proliferation and cellular response to lipids and antibiotics.

In conclusion, these results highlight the complicacy of altered miRNAs' interactions and their role in regulating the cellular mechanisms in *H. pylori* infection, mostly in gastric carcinogenesis pathways.

Συντμήσεις

ABL	Tyrosine-protein kinase ABL1, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADAM17	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17
ADAR1	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase
AGO	Argonaute protein
AGS cell line	Human gastric adenocarcinoma epithelial cell line
AKT/Rac	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Proto-oncogene c-Akt
AP-1	Activator Protein 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
аРКС	atypical Protein Kinase C
Arp2/3	Actin-related proteins 2/3
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated protein kinase
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	BCL2-associated X protein
BCDIN3D	Pre-miRNA 5'-monophosphate methyltransferase
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11
BNIP3I	BCI 2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
	Cytotoxin-associated gene A
	caa nathogenicity island
	cyclic Adenosine Mononhosphate
CAT	Chemokine (C-C motif) Ligand 20 Liver Activation Regulated Chemokine (LARC)
CCL20	Macronhage Inflammatory Protein-3 (MIP3A)
	CD44 antigen Cluster of Differentiation 44 Enican Extracellular Matrix Recentor III
CD44	Henaran Sulfate Proteoglycan
CD44v	CD44 solice variant
	Cadherin-1 CAM 120/80 E-cadherin(enithelial cadherin) Llyomorulin CD324
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 24
	Homeobox protein CDX-2 Caudal-type homeobox protein 2
CUAL	cellular Inhibitor of Anontosis 1. Baculoviral IAP reneat-containing protein 2 (BIRC2)
cIAP-1	TRAE-signaling complex protein 2 (TNER2), type F3 ubiquitin transferase BIRC2 (BING)
СК1	Keratin 1
C-MET	tyrosine-protein kinase Met Henatocyte Growth Factor Recentor (HGER)
	Myc proto-oncogene protein
	Cyclopyygenase-2 Prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2)
CRER	c/MD response element-binding protein
Cak	C-Src Kinase Tyrosine-protain kinase CSK
	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-2-Grabbing Non-integrin, CD209
	DiGeorge syndrome critical region 8. Microprocessor complex subunit DGCR8
	DNA (cytosino 5) motbultransforaso 1
E2E1	Transcription factor E2E1 Botingblactoma binding protoin 2 (PPPD 2)
	Enithelial_to_Mesenchymal Transition
	Percenter tyrosing protein kingsg orb. 4. Tyrosing kingsg tyros cell surface recenter HEP4
	Eventin-5 (VDO5)
	Enhancer of Zesta Hamalag 2. Historia lucina N. methyltransforasa E742
	Eacal Adhasian Kinasa, Dratain Turasina Kinasa 2 (DTK2)
	Apoptosis modiating surface antigon EAS TNED superfamily member 6 CD05
	Apoptosis-mediating surface antigen FAS, TNER Superfamily member 6, CD95
	False Discovery Rale
	FOIKIIEdu DOX P3, SCUITIII
100	y-giutamyitransferase, Giutathione hydrolase 1 proenzyme

GIT1	ARF GTPase-activating protein GIT1, G protein-coupled receptor kinase-interactor 1
GKN1	Gastrokine-1
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hBD1	beta-Defensin 1 (DEFB1)
HNRNPA1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1
HSP90	Heat Shock Protein 90, Hsp90 chaperone protein kinase-targeting subunit (CDC37)
IFN-γ	Interferon gamma
ΙΚΚβ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL-1	Interleukin-1 family
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (NOS2)
IRE1a	Inositol-requiring Enzyme 1 α, Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4, Lymphocyte-Specific Interferon Regulatory Factor (LSIRF),
	Multiple Myeloma oncogene 1 (MUM1)
JAK	Janus tyrosine-proteinkinase
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KRAS	GTPase KRas
KSRP	KH type-Splicing Regulatory Protein, Far upstream element-binding protein 2 (KHSRP)
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LIN28A	Protein Lin-28 homolog A, Zinc finger CCHC domain-containing protein 1 (ZCCHC1)
LL37	Antibacterial peptide LL-37, Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP)
LOX1	Lectin-like oxidized LDL receptor 1, OLR1
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid/ Lymphatic Tissue
MAPK/ERK	Mitogen-Activated Protein Kinase, Extracellular signal Regulated Kinase
MARK	MAP/microtubule affinity-Regulating Kinase 1, Serine/threonine-protein kinase MARK1
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1, Bcl-2-like protein 3 (BCL2L3)
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7, CDC47
MCPIP1	Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1, Endoribonuclease ZC3H12A
MD2	MD-2 Protein, Lymphocyte antigen 96 (LY96)
	Methylated-DNA-binding-protein-cysteine Methyltransferase, O-6-methylguanine-DNA-
MGMT	alkyltransferase (AGT, AGAT)
MKK3	Mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 3, MAPKK3
MLC	Myosin Light Chain
	MutL protein homolog 1, DNA mismatch repair protein Mlh1,
MLH1	Colon Cancer, Nonpolyposis Type 2, COCA2
	Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage Leukemia protein 1, Lymphoblastic Leukemia 1 (ALL-1)
MLL	Histone-lysine N-methyltransferase 2A (KMT2A), Acute
MMP	Matrix Metalloproteinase, Matrixin
MMR	DNA mismatch repair
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
MYOD1	Myoblast Determination protein 1
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-ĸB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-like Receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptor
NUP153	Nuclear pore complex protein Nup153. Nucleoporin 153
p21 ^{CIP1/WAF1}	Cvclin-Dependent Kinase inhibitor 1 (CDKN1A). CDK-interacting protein 1
p27 ^{Kip1}	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B (CDKN1B)
	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A (PRKRA).
PACT	PKR-associated protein X
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAR1	Serine/threonine-protein kinase MARK2
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1. CD274. B7 homolog 1 (B7-H1)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4.5-bisphosphate 3-Kinase. Catalytic subunit Alpha
piRNA	niwi-interacting RNA
r	F

סעס	Protein Kinase R, Protein kinase RNA-activated, interferon-induced, double-stranded RNA-
PKK	activated protein kinase, eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2(EIF2AK2)
Pol-II	DNA polymerase II
PPI	Proton Pump Inhibitor
pre-miRNA	precursor-miRNA
pri-miRNA	primary-miRNA
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAN-GTP	RAs-related Nuclear protein, GTP-binding nuclear protein Ran
Ras	RAt Sarcoma, Ras superfamily of small GTPases
RIP	Receptor Interacting serine/threonine kinase 1
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPTPb	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type Z1 (PTPRZ1), Phosphacan
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SEK	C-Terminal Src-family Kinase Tyrosine-protein kinase CSK
511	Tyrosine-protein phosphatase non-recentor type 11 (PTPN11) protein-tyrosine phosphatase
SHP-2	1D (PTP-1D) protein-tyrosine phosphatase 2C (PTP-2C)
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T4SS	Type IV Secretion System
ΤΔΚ1	TGE-beta-Activated Kinase 1 Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase 7 (MAP3K7)
	Discloading accellant suburit TADDD2 Trans Activation Despensive (TAD) DNA Disding Protein
TCE/LEE	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor
TCF/LEF	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor
TCF/LEF TCR TDP/13	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43
TCF/LEF TCR TDP43 TGE-B	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Tb	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T beloer cell
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2)
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3	Risc-loading complex subdime trakBP2, trans-activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-II-1 recentor domain
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPP	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Mathyl acconting champtavis transmombrane concerv protein (MCD like protein)
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLP	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein)
TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF σ	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Negrosis Factor alpha
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TBASE2	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T segulation cell
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg	Risc-loading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF	Risc-loading complex suburit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TARBP 2/ TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7	Risc-loading complex subunit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6)
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR	Risc-loading complex subunit TARBP2, trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor / Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA	Risc-loading complex subulit TARBP2, trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF	Risc-iolading complex subdinit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transactive Response (TAR) DNA-binding protein 43 Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF)
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF WHO	RISC-Ioading complex subulit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF) World Health Organization
TARBP 2/ TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TlpB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF WHO xCT	RISC-Iodading Complex Subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF) World Health Organization Cystine/glutamate transporter (SLC7A11), Calcium Channel Blocker Resistance Protein (CCBR1)
TARBP2/TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TlpB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF WHO xCT XIAP	RISC-Iodading Complex Subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF) World Health Organization Cystine/glutamate transporter (SLC7A11), Calcium Channel Blocker Resistance Protein (CCBR1) X-linked inhibitor of apoptosis protein, inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3),
TARBP 2/ TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF WHO xCT XIAP	RISC-Iodading complex subditit TARBP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta Thelper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-IL-1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-ILike Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotoxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF) World Health Organization Cystine/glutamate transporter (SLC7A11), Calcium Channel Blocker Resistance Protein (CCBR1) X-linked inhibitor of apoptosis protein, inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3), baculoviral IAP repeat-containing protein 4 (BIRC4)
TARBP 2/ TRBP TCF/LEF TCR TDP43 TGF-β Th TIM3 TIR TIPB TLR TNF-α TRAF2 Treg TRIF TUT7 UTR VacA VEGF WHO xCT XIAP ZEB1	RISE-loading complex subdime TARKP2, Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-Binding Protein Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor T-cell receptor Transforming Growth Factor beta T helper cell T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Hepatitis A virus cellular receptor 2(HAVCR2) Toll-L1 receptor domain Methyl-accepting chemotaxis transmembrane sensory protein (MCP-like protein) Toll-like Receptor Tumor Necrosis Factor alpha TNF Receptor-Associated Factor 2 T regulatory cell, suppressor T cell TiR-domain-containing adapter-inducing interferon-β Terminal Uridylyltransferase 7, Zinc finger CCHC domain-containing protein 6 (ZCCHC6) Untranslated Region Vacuolating Cytotxin Autotransporter Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Permeability Factor (VPF) World Health Organization Cystine/glutamate transporter (SLC7A11), Calcium Channel Blocker Resistance Protein (CCBR1) X-linked inhibitor of apoptosis protein, inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3), baculoviral IAP repeat-containing protein 4 (BIRC4) Zinc finger E-box-binding homeobox 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (Helicobacter pylori)

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori, H. pylori, Hp*) ανακαλύφθηκε από τους Barry Marshall & Robin Warren στις αρχές της δεκαετίας του 1980, οι οποίοι πρώτοι απέδειξαν την παρουσία του σε γαστρικές βιοψίες από ασθενείς με γαστρίτιδα και πεπτικό έλκος.¹ Η ανακάλυψη αυτή ανέτρεψε το δόγμα του ακατοίκητου από μικροοργανισμούς στομάχου λόγω της υψηλής του οξύτητας κι άλλαξε ριζικά την αντιμετώπιση των γαστρικών διαταραχών ως οφειλόμενες σε μολυσματικό παράγοντα.

Η παρουσία βακτηρίων στο στομάχι είχε ήδη αναφερθεί από πολλούς, Albrecht Edwin Klebs (1881), Giulio Bizzozero (1893) και Solomon (1896). Το 1905 διατυπώνεται η θεωρία ότι το έλκος προκαλείται από την υπερέκκριση γαστρικού οξέος και ξεκινά η χορήγηση αντιόξινων σκευασμάτων για τη θεραπεία του. Η θεώρηση αυτή επικρατεί μέχρι τη δεκαετία του 1950, μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming (1928), όπου αρχίζει η μαζική παραγωγή της κατά τη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου. Την περίοδο αυτή αρχίζουν να εμφανίζονται αναφορές για τη θεραπεία του έλκους με τη χορήγηση αντιβιοτικών, με πλέον κλασική την περίπτωση του Ιωάννη Λυκούδη (1910-1980). Το 1958 ο Λυκούδης διαπιστώνει ύφεση του χρόνιου πεπτικού έλκους και της αιμορραγικής γαστρεντερίτιδας μετά τη λήψη αντιβιοτικών, οδηγώντας τον στο συμπέρασμα ότι υποκρύπτεται κάποιος βακτηριακός παράγοντας. Δοκιμάζοντας διάφορα αντιβιοτικά, κατέληξε σε ένα θεραπευτικό σχήμα το οποίο χορηγούσε υπό τη μορφή ενός χαπιού με το όνομα «Ελγάκο» (<u>έλ</u>κος-<u>γα</u>στρίτιδα-<u>κο</u>λίτιδα), το οποίο έλαβε δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από το ελληνικό κράτος το 1961. Το 1966 προσπάθησε να δημοσιεύσει τα αποτελέσματά του στο JAMA (Journal of the American Medical Association) αλλά απορρίφθηκε, το 1967 διώχθηκε για τη διανομή του φαρμάκου του και το 1968 καταδικάσθηκε από τον Ιατρικό Σύλλογο Αθηνών (ΙΣΑ). Η προσφορά του αναγνωρίσθηκε το 1999 με δημοσίευση στο περιοδικό Lancet, ενώ η απόφαση του ΙΣΑ ανακλήθηκε το 2006, μετά την απονομή του βραβείου Nobel στη φυσιολογία ή την ιατρική (2005) στους Marshall και Warren.²

1.2 Επιδημιολογία της *Η. pylori* λοίμωξης

Πάνω από το πενήντα τοις εκατό του παγκόσμιου πληθυσμού φέρει αυτόν τον παθογόνο παράγοντα, καθιστώντας την *Η. pylori* την πιο κοινή βακτηριακή λοίμωξη παγκοσμίως. Αν και τα περισσότερα άτομα με *Η. pylori* λοίμωξη παραμένουν ασυμπτωματικά, μια μειοψηφία ασθενών μπορεί να αναπτύξει γαστρικά ή δωδεκαδακτυλικά έλκη (10-15%), γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (1-3%) ή Β κυτταρικό MALT λέμφωμα (<1%).³ Ωστόσο, το ένα μόνο τοις εκατό του μισού παγκόσμιου πληθυσμού αντιπροσωπεύει έναν τεράστιο αριθμό ατόμων που μαστίζονται από τον καρκίνο του στομάχου, για αυτό ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί σήμερα την τρίτη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο παγκοσμίως και για το λόγο αυτό ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ταξινόμησε το *Helicobacter pylori* ως καρκινογόνο πρώτης τάξης.⁴

Η μόλυνση από το *Η. pylori* πραγματοποιείται συνήθως νωρίς στην παιδική ηλικία και αν δεν αντιμετωπιστεί με αντιμικροβιακή θεραπεία, τα βακτήρια μπορούν να παραμείνουν εφόρου ζωής. Αν και η *Η. pylori* λοίμωξη συσχετίζεται συχνά με μια ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία ελέγχεται από τον έμφυτο και τον προσαρμοστικό κλάδο του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, τα βακτήρια δεν εξαλείφονται. Έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής από το *Hp* το οποίο έγινε το πρώτο παράδειγμα ενός επίμονου βακτηριακού παθογόνου που προκαλεί χρόνιες λοιμώξεις.^{5–7} Η σοβαρότητα και τα παθολογικά επακόλουθα της διάχυτης οξείας και αργότερα της χρόνιας φλεγμονής προσδιορίζονται από τη βακτηριακή λοιμοτοξικότητα, το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.⁸ Ο γαστρικός καρκίνος είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας σειράς γεγονότων που διαρκούν δεκαετίες και προκύπτουν από τη συσσώρευση πολλαπλών γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων οι οποίες οδηγούν σε μεταβολές των μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η επιδιόρθωση του DNA, ο μεταβολισμός, οι διακυτταρικές και οι μεταξύ κυττάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αλληλεπιδράσεις, η απόπτωση, η αγγειογένεση και η ανοσοεπιτήρηση.⁹



Εικόνα 1.1 Παγκόσμια επίπτωση της λοίμωξη από το Helicobacter pylori. [Burkitt et al. 2017]¹⁰

Ο γαστρικός καρκίνος είναι παγκοσμίως η πέμπτη σε επίπτωση κακοήθεια με 952.000 νέα κατ' έτος περιστατικά (6,8% του συνολικού αριθμού καρκίνων). Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των χωρών και η πλειονότητα των περιπτώσεων καταγράφονται στις αναπτυσσόμενες χώρες με χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό υπόβαθρο, εκ των οποίων οι μισές εμφανίζονται στην Ανατολική Ασία. Η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου είναι διπλάσια στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι περιβαλλοντικοί, ορμονικοί ή/και γενετικοί παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισής του. Είναι η τρίτη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο (723.000 θανάτους κατ' έτος ή 8,8% όλων των θανάτων από καρκίνο) με την *Η. pylori* λοίμωξη να αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου που σχετίζεται με την *Ηρ* λοίμωξη με CagA⁺ στελέχη είναι 2-3 φορές υψηλότερος από εκείνον με CagA⁻.⁹

Φαίνεται πως το 89% όλων των περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου κατ' έτος (περίπου 780.000 περιπτώσεις) οφείλονται στη λοίμωξη, καθιστώντας το *Hp* υπεύθυνο για τουλάχιστον το 6,2% όλων των περιπτώσεων καρκίνου παγκοσμίως. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι παρόμοιο με το ποσοστό επίπτωσης με τα υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται στην Ανατολική Ασία. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας του γαστρικού καρκίνου οφείλονται στην έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων, επακόλουθη αργοπορημένη διάγνωση, απουσία παρακολούθησης και στις αναποτελεσματικές θεραπείες. Έτσι, η πλειονότητα των ασθενών παρουσιάζουν όγκους προχωρημένου σταδίων είναι περίπου 25% και η μέση συνολική επιβίωση είναι μικρότερη του ενός έτους. Η επίπτωση και η θνησιμότητα από γαστρικό καρκίνο έχουν μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες κι αυτό σχετίζεται με τη μείωση του επιπολασμού του *Η. pylori*, πιθανώς ως αποτέλεσμα των βελτιωμένων συνθηκών διαβίωσης και υγιεινής, καθώς και της ευρείας χρήσης αντιβιοτικών. Παρόλα αυτά, και παρά τους μειούμενους ρυθμούς, η παγκόσμια επιβάρυνση του γαστρικού καρκίνου αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια λόγω των δημογραφικών επιπτώσεων της αύξησης και της γήρανσης του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο.⁹

Αξίζει να σημειωθεί ότι δε θα αναπτύξουν γαστρικό καρκίνο όλα τα άτομα που έχουν μολυνθεί από το *H. pylori*, πράγμα που δείχνει πως η ασθένεια αυτή είναι πολυπαραγοντική. Πράγματι, οι γενετικοί παράγοντες του ξενιστή που επηρεάζουν τη φλεγμονώδη απόκριση στους μολυσματικούς παράγοντες και ο τρόπος ζωής, όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ,⁹ η ανεπάρκεια σιδήρου¹¹ και η υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι διατροφή, συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, ενώ η εκρίζωσή του μειώνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισής του.⁹



Εικόνα 1.2 Χρονοδιάγραμμα εξέλιξης της Η. pylori λοίμωξης.¹²

Όλα τα μολυσμένα άτομα αναπτύσσουν μια επιπολής γαστρίτιδα εντός των πρώτων εβδομάδων της μόλυνσης, ακολουθούμενη από μια χρόνια ενεργό γαστρίτιδα που αναπτύσσεται μετά από μήνες ή χρόνια. Μετά από δεκαετίες, οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν γαστρίτιδα στο άντρο ή παγγαστρίτιδα, ανάλογα με τον εντοπισμό της λοίμωξης. Η φλεγμονή στο άντρο μπορεί να οδηγήσει σε γαστρική μεταπλασία, η οποία υποστηρίζει την ανάπτυξη του δωδεκαδακτυλικού έλκους. Το τελευταίο μπορεί να οδηγήσει σε ατροφία και εντερικού τύπου μεταπλασία, δύο προϋποθέσεις για την ανάπτυξη γαστρικού έλκους ή γαστρικού καρκίνου. Αντίθετα, η συνεχής χρόνια ενεργός γαστρίτιδα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη MALT λεμφώματος. [Τροποποίηση από Bauer & Meyer 2011]¹

1.3 Μετάδοση, Διάγνωση & Θεραπεία της Η. pylori λοίμωξης

Έχουν περιγραφεί διάφορες οδοί για τη μετάδοση του *Hp*, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι. Η στοματο-στοματική, η γάστρο-στοματική (έκθεση σε έμεσμα) και η έντεροστοματική οδός θεωρούνται ως οι πιθανότεροι τρόποι μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο.¹⁰ Τα στοιχεία που αποδεικνύουν τη σημασία των στενών επαφών των ατόμων για τη μετάδοση της λοίμωξης προέρχονται από μελέτες που δείχνουν αυξημένο επιπολασμό σε νοσοκομεία και ιδρύματα και παρόμοια χαρακτηριστικά της λοίμωξης (ίδια στελέχη) μέσα στις οικογένειες, ειδικότερα μεταξύ μητέρας και παιδιών και μεταξύ αδελφών, αλλά και στα άτομα που κατοικούν στο ίδιο σπίτι. Η ανίχνευση του βακτηρίου στα σωματικά υγρά, όπως τα κόπρανα, τα γαστρικά υγρά, τα ούρα και το σάλιο, επίσης υποστηρίζουν τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ορισμένες μελέτες έχουν, επίσης, δείξει ότι η μόλυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί από το περιβάλλον μέσω μολυσμένων υδάτων, ειδικά σε περιοχές με ανεπαρκείς δομές επεξεργασίας του νερού ή από τα ζώα, οικόσιτα ζώα όπως τα πρόβατα ή από τις οικιακές μύγες. Κατά συνέπεια, η επαφή με μολυσμένο νερό ή μολυσμένα ζώα μπορεί να αποτελέσει πρόσθετο κίνδυνο μόλυνσης.^{12,13} Η μετάδοση μπορεί να γίνει και κατά την εργασία, με στενή προσωπική επαφή με τους μολυσμένους ασθενείς ή με τα σωματικά τους υγρά.¹⁴ Στην πραγματικότητα, η ιατρογενής μόλυνση μετά από ενδοσκόπηση είναι ο μόνος μέχρι σήμερα αποδεδειγμένος τρόπος μετάδοσης. Η σύνθετη δομή των ιατρικών συσκευών και η δυσκολία απολύμανσής τους καθιστούν την ιατρογενή μόλυνση έναν πιθανό παράγοντα κινδύνου *Η. pylori* μόλυνσης των εργαζομένων στην υγειονομική περίθαλψη. Παρόλο που υπάρχει κάποια συζήτηση σχετικά με τον επαγγελματικό κίνδυνο μετάδοσής του κι έχει δειχθεί ότι οι επαγγελματίες υγείας διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης, η *Η. pylori* λοίμωξη δεν αναγνωρίζεται ακόμη από τους διαφόρους καταλόγους επαγγελματικών ασθενειών που υπάρχουν, ενώ η ένταξή της θα μπορούσε να οδηγήσει σε έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, καθώς και σε πρόληψη και έλεγχο της μετάδοσής της σε αυτούς τους χώρους εργασίας.¹³

Οι διαγνωστικές δοκιμασίες για το *Η. pylori* ταξινομούνται σε επεμβατικές και μη-επεμβατικές. Οι επεμβατικές περιλαμβάνουν την ιστολογική εξέταση γαστρικού ιστοτεμαχίου, ενώ οι μηεπεμβατικές δοκιμές βασίζονται στην εξέταση περιφερικού αίματος, αναπνοής, σάλιου, ούρων και κοπράνων, με σκοπό την ανίχνευση αντισωμάτων, βακτηριακών αντιγόνων ή δραστικότητας της ουρεάσης. Η επιλογή της κατάλληλης δοκιμασίας εξαρτάται από την εμπειρία και τις διαθέσιμες κλινικές υποδομές, ενώ συνήθως προτείνεται ο συνδυασμός δύο μεθόδων, καθώς για παράδειγμα, η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του *Ηρ* δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα τρέχουσα λοίμωξη.¹⁵

Παρόλο που το *Hp* έχει ευαισθησία σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών *in vitro*, η δράση τους αποτυγχάνει *in vivo* εάν αυτά λαμβάνονται μεμονωμένα. Συνεπώς, πραγματοποιείται συνδυαστική θεραπευτική προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει δύο ή τρία αντιβιοτικά (κλαριθρομυκίνη, σε συνδυασμό με αμοξικιλλίνη ή/και μετρονιδαζόλη) και μια ένωση βισμουθίου ή/και κάποιο PPI. Η χρήση αυτών των φαρμάκων συντελεί στην αποτελεσματική θεραπεία, με ποσοστά εκρίζωσης πάνω από 80%. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, εντοπίζονται διαρκώς ανθεκτικά στελέχη, οδηγώντας στη διερεύνηση εναλλακτικών φαρμάκων και στρατηγικών θεραπείας.¹⁶ Σε περιπτώσεις συλλοίμωξης *Hp* με έλμινθες έχει παρατηρηθεί σημαντικά χαμηλότερη βαρύτητα συμπτωμάτων,¹⁷ επομένως, θα ήταν δυνατό να χορηγηθεί χαμηλή δόση ανοσορρυθμιστικών παραγόντων σε *Hp*⁺ ασθενείς, προκειμένου να προκληθεί παρόμοιο αποτέλεσμα. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η χορήγηση προβιοτικών. Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι το *H. pylori* εκτοπίζεται από τους γαλακτοβακίλλους τόσο *in vitro* όσο και σε περιορισμένη έκθεση *in vivo*.¹⁸ Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως συμπληρώματα με γαλακτοβακίλλους μπορούν να μειώσουν οριακά την πυκνότητα του *Hp* και της συνακόλουθης φλεγμονής^{19,20} ενώ έχουν συνδεθεί και με αύξηση του ποσοστού εκρίζωσης του παθογόνου.¹⁵

Κατά την περασμένη δεκαετία έγινε μεγάλη προσπάθεια για την ανάπτυξη στρατηγικών εμβολιασμού. Μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί αποτελεσματικός εμβολιασμός μόνο σε ζωικά μοντέλα, ενώ καμία δοκιμή εμβολίου στον άνθρωπο δεν απέβη επιτυχής. Τα πιθανά αίτια εντοπίζονται στην *Hp*-ειδική ανοσολογική απόκριση αλλά και σε ανατομικές διαφορές του στομάχου.²¹

1.4 Δομή & Γονιδίωμα του Helicobacter pylori

Το *H. pylori* είναι ένα μικροαερόφιλο Gram⁻ παθογόνο βακτήριο που εγκαθίσταται στον ανθρώπινο γαστρικό βλεννογόνο κι εμφανίζει θετικές αντιδράσεις σε καταλάση, οξειδάση και ουρεάση, από τις οποίες η τελευταία είναι ιδαίτερα γρήγορη και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή του.^{6,22} Αν και συνήθως απαντάται σε σπειροειδές σχήμα, διαστάσεων 2-4 μm σεμήκος και 0,5-1 μm σε πλάτος, εμφανίζεται και σε ραβδοειδές ενώ παρουσιάζει κοκκώδες σχήμα ύστερα από παρατεταμένη *in vitro* καλλιέργεια ή αντιβιοτική θεραπεία.²³ Επιπλέον, φέρει 2-6 μαστίγια με κολεό, περίπου 3 μm σε μήκος, τα οποία συχνά απολήγουν σε μια διακριτή διόγκωση. Τα μαστίγια προσφέρουν κινητικότητα κι επιτρέπουν στο βακτήριο να κινείται ταχέως μέσα σε πηκτά διαλύματα, όπως είναι η στιβάδα βλέννης που καλύπτει το γαστρικό επιθήλιο.²⁴ Το *Hp* παρουσιάζει εξαιρετική γενετική ποικιλότητα, το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι περίπου 1,7 Mbps, με ποσοστό GC 35-40% και περιλαμβάνει περίπου 1500 γονίδια με δύο αντίγραφα των rDNA γονιδίων.²⁵ Πολλά στελέχη διαθέτουν ένα ή περισσότερα πλασμίδια, τα οποία δεν φαίνεται να φέρουν γονίδια μολυσματικότητας ή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.²⁶



Εικόνα 1.3 *Το Helicobacter pylori όπως* φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM). [Lee&O'Rourke]²⁷

Τα βακτηριακά T4SS εκκριτικά συστήματα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά μακρομορίων τόσο των Gram⁻ όσο και των Gram⁺ βακτηρίων. Μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: συζευκτικά, μετατόπισης τελεστή και συστήματα μεταφοράς/πρόσληψης DNA.²⁸ Τα συνηθέστερα και πιο καλά μελετημένα είναι τα συζευκτικά T4SS συστήματα τα οποία έχουν σημαντική ιατρική σημασία λόγω της ικανότητάς τους για εκτεταμένη μετάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή γονιδίων μολυσματικότητας.²⁹

Το *Hp* διαθέτει διάφορα T4SS συστήματα μεταφοράς, το comB εμπλέκεται στη μεταφορά δίκλωνου DNA, το συζευκτικού τύπου tfs3 που πιθανολογείται ότι αποκτήθηκε από ένα γεγονός οριζόντιας μεταφοράς, το tfs4 το οποίο αποτελεί ένα πλήρες T4SS και πιθανώς μέσω αυτού πραγματοποιείται οριζόντια μονόδρομη μεταφορά γονιδιωματικού *Hp* DNA. Το tfs4 περιέχει το γονίδιο *dupA* που έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο δωδεκαδακτυλικού έλκους και τα *dupA*⁺ στελέχη έχει αναφερθεί ότι επάγουν αυξημένη έκφραση IL-8 στον γαστρικό βλεννογόνο του άντρου, ενώ τα *dupA*⁻ κλινικά στελέχη έχουν μειωμένη ικανότητα να διεγείρουν την παραγωγή IL-12 από μονοπύρηνα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Τέλος, το cagT4SS του οποίου οι πρωτεΐνες για τη συγκρότησή του (CagT, CagX, CagY, CagM, Cag3, CagF, CagL,CagI), αλλά και η CagA ογκοπρωτεΐνη, που αποτελεί τον κύριο τελεστή του και την οποία ενίει το βακτήριο στο κύτταρο-ξενιστή κατά την προσκόλλησή του σε μόρια ιντεγκρίνης, κωδικοποιούνται από τον 40kb *cagPAI* γονιδιακό τόπο. Το *cagT*4SS (εφεξής "T4SS") είναι το πρώτο γνωστό T4SS που μπορεί να μεταφέρει διαφορετικές κατηγορίες υποστρωμάτων εκτός του πλασμιδιακού DNA, όπως την CagA πρωτεΐνη, μόρια πεπιδογλυκάνης, αλλά και γονιδιωματικό DNA.^{30,31}

Οι πρωτεΐνες CagY, CagA, CagL και CagI έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή κατά τη βακτηριακή προσκόλληση. Οι ιντεγκρίνες σχηματίζουν μία οικογένεια ετεροδιμερών διαμεμβρανικών υποδοχέων αποτελούμενων από υπομονάδες α και β και είναι απαραίτητες για τη διακυτταρική προσκόλληση και την αλληλεπίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Οι δύο υπομονάδες σχηματίζουν έναν εύκαμπτο υποδοχέα. Όταν είναι αδρανείς, οι ιντεγκρίνες εμφανίζουν κάμψη, αλλά μόλις ενεργοποιηθούν, οι δύο υπομονάδες υφίστανται θεαματικές στερεοδιατακτικές αλλαγές που οδηγούν σε εκτεταμένη διαμόρφωση. Αυτές οι διαφορετικές διαμορφώσεις σχετίζονται με γεγονότα σηματοδότησης στο κύτταρο από έξω προς τα μέσα ή/και αντίθετα που μεταδίδονται μέσω διαμεμβρανικών περιοχών με αυστηρά ελεγχόμενο



Εικόνα 1.4 Η ένεση της CagA και τα κυτταρικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται. (a) Μονοπάτια της φωσφορυλιωμένης (κόκκινοι κύκλοι) και μη φωσφορυλιωμένης (ροζ) CagA. (b) Σχηματική αναπαράσταση της ένεσης της CagA από το cagT4SS. Πιθανώς απαιτείται αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της α5β1 ιντεγκρίνης για τη μετατόπιση της CagA. [Τροποποίηση από Bergé & Terradot 2017]³¹

Αν και η μετατόπιση της CagA *in vivo* είναι δύσκολο να αποδειχθεί,³² είναι γνωστό πως οι ιντεγκρίνες εκφράζονται αποκλειστικά στη βασοπλευρική όψη του πολωμένου επιθηλίου.^{33,34} Η κορυφαία μεταφορά της CagA μέσω φωσφατιδυλοσερίνης και χοληστερόλης είχε προταθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός,³⁵ όμως, η αποκάλυψη της αλληλεπίδρασης της CagL με τον α5β1 υποδοχέα ιντεγκρίνης οδήγησαν στην υπόθεση ότι το *Hp* χρειάζεται να έρθει σε επαφή με τη βασοπλευρική μεμβράνη διαρηγνύοντας τους διακυτταρικούς συνδέσμους, ενώ έχει αποδειχθεί ότι το βακτήριο αυξο-ρυθμίζει αρκετές πρωτεάσες της Ε-καδερίνης, όπως τις MMP-1, MMP-3³⁶, MMP-7, MMP-9, MMP-10 και ADAM-10. Επιπλέον, το *cagY* γονίδιο μπορεί να υποβληθεί σε αναδιατάξεις στις επαναλαμβανόμενες περιοχές της πρωτεΐνης δημιουργώντας ποικιλομορφία στο *Hp*, διευκολύνοντας έτσι την ανοσοδιαφυγή.³¹ Παρόλα αυτά, εάν η κορυφαία ή/και βασοπλευρική μετατόπιση της CagA πραγματοποιούνται σε συνδυασμό παραμένει ακόμη άγνωστο.³²

1.4.1 Η CagA ογκοπρωτεΐνη του Helicobacter pylori

Μετά τη διείσδυσή της στα γαστρικά κύτταρα, η CagA φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης σε EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) μοτίβα από τις κυτταρικές κινάσες Src και Abl και μιμείται έναν ξενιστικό παράγοντα (την πρωτεΐνη pragmin³⁷) για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης που επηρεάζουν το δυναμικό της μεμβράνης, προκαλούν διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσμων, κυτταροσκελετικές μεταβολές κι επάγουν μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με προ-φλεγμονώδεις (NF-κB) και αντι-αποπτωτικές αποκρίσεις, αλλά και με την προώθηση του κυτταρικού κύκλου.³⁸ Το γονίδιο *cagA* είναι πολυμορφικό, με τα μοτίβα EPIYA να κατηγοριοποιούνται ως EPIYA-A, B, C ή D ανάλογα με τις πλευρικές αλληλουχίες. Τα μοτίβα EPIYA-A, EPIYA-B είναι γενικά παρόντα σε όλες τις αλληλουχίες CagA, τα στελέχη που φέρουν το EPIYA-C

μοτίβο απαντώνται συνήθως στη Δύση (Ευρώπη & Αμερική), ενώ το ΕΡΙΥΑ-D είναι το Ανατολικού τύπου (Ασία).³⁸ Ο αριθμός των επαναλήψεων του ΕΡΙΥΑ-C μοτίβου ή η παρουσία ενός ΕΡΙΥΑ-D αυξάνει το δυναμικό των SHP-2 αλληλεπιδράσεων και συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο εντερικής μεταπλασίας και γαστρικού καρκίνου.³ Η CagA διαθέτει επίσης το CRPIA μοτίβο που ευθύνεται για τη δραστικότητά της που δεν εξαρτάται από τη φωσφορυλίωσή της κι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της ΜΕΤ, η οποία οδηγεί σε επαγωγή του PI3/AKT μονοπατιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των β-κατενίνη κι NF-κB που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή, αντίστοιχα.³⁹ Η μη φωσφορυλιωμένη CagA έχει δειχθεί ότι, επιπλέον των μιτογόνων και προ-φλεγμονωδών της δράσεων, εξασθενεί επίσης τους διακυτταρικούς συνδέσμους προκαλώντας απώλεια της κυτταρικής πολικότητας.³²

Η CagA δεσμεύεται άμεσα σε ορισμένα συστατικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) είναι ένα συστατικό της ευκαρυωτικής πλασματικής μεμβράνης που βρίσκεται στο εσωτερικό φύλλο της διπλοστιβάδας και κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης του Η. pylori, η αποσταθεροποίηση της μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την παροδική εξωτερίκευση της PS στη θέση προσκόλλησης του βακτηρίου.³⁵ Η CagA βρέθηκε να αλληλεπιδρά ειδικά με τη PS, και προτάθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ενδοκυττάρωση της πρωτεΐνης.³⁵ Η προσκόλληση της CagA στη PS της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή μπορεί επίσης να έχει πρόσθετες συνέπειες, καθώς η H. pylori λοίμωξη συνδέεται και με ασθένειες εκτός του στομάχου, συμπεριλαμβανομένων καρδιαγγειακών παθήσεων, αιματολογικών παθήσεων, σακχαρώδους διαβήτη και ιδιοπαθούς παρκινσονισμού. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα θα μπορούσαν να απελευθερώνουν εξωσώματα που περιέχουν την CagA.⁴⁰ Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια που παράγονται από διάφορους κυτταρικούς τύπους μέσω εξωκυττάρωσης και είναι ικανά να διαχέονται στο αίμα. Μετά την απομόνωσή τους, τα εξωσώματα που περιέχουν CagA είναι ικανά να προκαλέσουν μορφολογικές μεταβολές όταν επωάζονται με κύτταρα in vitro, υποδηλώνοντας ότι η CagA μπορεί να μεταφερθεί με αυτό τον τρόπο και σε άλλα μέρη του ανθρωπίνου σώματος.⁴⁰

Η CagA σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου καθώς ρυθμίζει άμεσα την ενεργότητα ογκοκασταλτικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις RUNX3 και ASPP2. Η ASPP2 είναι μια προαποπτωτική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την p53 μετά από βλάβη του DNA ή ογκογόνα ερεθίσματα, προάγοντας την απόπτωση.³¹ Η CagA σχηματίζει σύμπλεγμα με την ASPP2 στη μεμβράνη, εμποδίζοντας έτσι την ανθρώπινη πρωτεΐνη να παίξει το ρόλο της στον πυρήνα, προκαλώντας μείωση της απόπτωσης.⁴¹ Η CagA αλληλεπιδρά με την ογκοκατασταλτική RUNX3 διεγείροντας την αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα, προάγοντας έτσι την καρκινογένεση.⁴²

Μια άλλη πιθανή ογκογόνος δράση της CagA στο κύτταρο-ξενιστή είναι οι αλληλεπιδράσεις της με πρωτεϊνες σηματοδότησης που περιέχουν δομικές περιοχές SH2 καθώς δεσμεύεται επιλεκτικά σε αυτές, όπως οι Grb2, SHP-2 φωσφατάση και Csk κινάση, διαταράσσοντας πολλαπλά κυτταρικά μονοπάτια και οδηγώντας σε κυτταρικό μετασχηματισμό. Οι SHP-1 και SHP-2 φωσφατάσες αποτελούν βασικούς στόχους της CagA κι εμπλέκονται στα μονοπάτια σηματοδότησης μίας ποικιλίας αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. Η φωσφορυλιωμένη CagA ενεργοποιεί την SHP-2 η οποία επάγει το Erk1/2 μονοπάτι, απορρυθμίζει τη δραστικότητα φωσφατάσης και προκαλεί πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Η SHP-2 επάγει, επίσης, την αποφωσφορυλίωση και αδρανοποίηση των SFK κινασών, με αποτέλεσμα το μορφολογικό μετασχηματισμό και δραματικές κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις σε μεταγενέστερα στάδια της λοίμωξης. Η απενεργοποιήση των SFK έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της βινκουλίνης διαταράσσοντας την αλληλεπίδρασή της με την Αrp2/3, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό λαμελλοποδίων και μειωμένο αριθμό εστιακών συμφύσεων.³¹ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ένα τμήμα της CagA ομοιάζει με την περιοχή δέσμευσης της ευκαρυωτικής F-ακτίνης και είναι εξαιρετικά

συντηρημένο, αν και δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής αυτής και της ακτίνης.⁴³

Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση των στενοσυνδέσμων και των συνδέσμων προσκόλλησης, καθώς και των μονοπατιών σηματοδότησης που επηρεάζονται κατά την Η. pylori λοίμωξη. [Τροποποίηση από Backert *et al.* 2017]³²



(a) Οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions, TJ) ανοίγουν υπό την επίδραση της VacA με έναν άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό (1). Το Hp ενίει την CagA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή μέσω του T4SS και αυτή συνεντοπίζεται με τις πρωτεΐνες ZO-1 και JAM (2). Η συνολική ακεραιότητα των στενοσυνδέσμων διατηρείται από ένα ρυθμιστικό σύμπλοκο (γκρίζος κύκλος) που περιλαμβάνει τις aPKC, Cdc42, Rac1, Par3 και Par6. Η aPKC φωσφορυλιώνει την Par1b κινάση η οποία ρυθμίζει την κυτταρική πολικότητα (3). Η CagA συνδέεται με την Par1b και αναστέλλει τη φωσφορυλίωσή της. Το σύμπλεγμα CagA-Par1b εκτοπίζεται στους ΤΙ και στις κορυφαίες μεμβράνες (4). Η σηματοδότηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη των ΤJ και την απώλεια της κυτταρικής πολικότητας (5). Το Ηρ διεγείρει επίσης την πυρηνική απόκριση του ξενιστή (6). Έτσι, διάφορες MMPs αυξο-ρυθμίζονται σε επίπεδο μεταγραφής, εκκρίνονται και διασπούν τις πρωτεΐνες των στενοσυνδέσμων (7). Ένας άλλος στόχος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Cdx2, ο οποίος αυξο-ρυθμίζει την έκφραση της κλωδίνης-2 (claudin-2) (8). Το Ηρ μπορεί επίσης να διεγείρει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της IL-1 (IL-1R), παίζοντας ρόλο στην ενεργοποίηση της ROCK κινάσης (9) και εν συνεχεία στη διάσπαση της κλωδίνης-4 (10). Η ουρεάση του Hp επηρεάζει επίσης τις πρωτεΐνες των στενοσυνδέσμων με δύο τρόπους, αρχικά επάγοντας τη φωσφορυλίωση της MLC από την MLCK κινάση (11) ή αυξάνοντας τα ελεύθερα επίπεδα NH4⁺ με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό της οκλουδίνης (occlusin) με έναν άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό (12).

(b) Το Hp στοχεύει τους συνδέσμους προσκόλλησης (adherence junctions, AJ) με πολλούς τρόπους. Τα βακτήρια ενίουν την CagA στο κύτταρο-ξενιστή όπου μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με την Ε-καδερίνη (1). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της β-κατενίνης από το σύμπλοκο της Εκαδερίνης και στη συνέχεια τη μεταφορά της στον πυρήνα. Έτσι, η β-κατενίνη δρα ως συμπαράγοντες για τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF που διεγείρουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, όπως τα πρωτο-ογκογονίδια κυκλίνη d1 και c-myc (2). Η απόκριση αυτή μπορεί να ενισχυθεί με τη μεταφορά της p120ctn στον πυρήνα η οποία αναστέλλει την ανασταλτική δράση της Kaiso στους TCF/LEF (3). Η απορρύθμιση του Wnt μονοπατιού, συμπεριλαμβανομένων των GSK-3b, APC, CK1 και Axin τροφοδοτεί το ίδιο μονοπάτι, επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, τον πυρηνικό εντοπισμό ή την αποικοδόμησή της (4). Η CagA σχηματίζει σύμπλοκο με τις Ε-καδερίνη, c-Met και p120ctn επηρεάζοντας τη διήθηση και τη μετανάστευση των κυττάρων (5). Η CagA μπορεί επίσης να συνδέεται στην GSK-3 μειώνοντας τη δραστικότητά της και σταθεροποιώντας, έτσι, τη Snail, ένα μεταγραφικό καταστολέα της έκφρασης της Εκαδερίνης (6). Το Hp ενεργοποιεί επίσης την μεταγραφή των MMPs (7), οδηγώντας σε αυξημένη έκκρισή τους και διάσπαση των πρωτεϊνών των συνδέσμων προσκόλλησης (8). Επιπλέον, το βακτήριο εκκρίνει την HtrA πρωτεάση σερίνης, η οποία μπορεί να διασπάσει απευθείας την Ε-καδερίνη (9). Ακόμη, ενεργοποιεί τον υποδοχέα της IL-1 (IL-1R) αυξο-ρυθμίζοντας την IL-1β, με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση του γονιδίου της Εκαδερίνης (cdh1) (10), την καταστολή της μετάφρασής του και τη μειω-ρύθμισή της σε πρωτεϊνικό επίπεδο (11). Το αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι μια τοπική διάσπαση της συνέχειας του επιθηλίου που επιτρέπει στο Ηρ να εισέλθει στο διακυτταρικό χώρο και να φθάσει στη βασική μεμβράνη (12). Με τον τρόπο αυτό, τα βακτήρια θα μπορούσαν πιθανώς να έχουν πρόσβαση στον υποδοχέα ιντεγκρίνης που βρίσκεται στη βασική πλευρά της μεμβράνης και να ενέσουν την CagA.



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση των στενοσυνδέσμων και των συνδέσμων προσκόλλησης, καθώς και των μονοπατιών σηματοδότησης που επηρεάζονται κατά την Η. pylori λοίμωξη. [Τροποίηση από Backert *et al.* 2017]³²

Η CagA μπορεί να τροποποιήσει τη δραστικότητα βασικών σηματοδοτικών ενζύμων. Συνδέεται με την PAR1/MARK κινάση και η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει τη δραστικότητα της PAR1/MARK, η οποία διαταράσσει την σηματοδότηση της aPKC και προκαλεί διάσπαση των στενοσυνδέσμων και απώλεια της κυτταρικής πολικότητας.⁴¹ Με τον τρόπο αυτό, η CagA επάγει ένα μορφογενετικό πρόγραμμα στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα που ομοιάζει με τον ΕΜΤ φαινότυπο, το οποίο μπορεί να είναι ένα πρώμο συμβάν στην καρκινογένεση που προκαλείται από το *Hp*.³¹ Η CagA

μιμείται, επίσης, την PKI έναν φυσικό αναστολέα της MARK2.⁴¹ Η CagA έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει το NF-κΒ μονοπάτι μέσω αλληλεπίδρασης με τις TRAF6 και TAK1,⁴⁴ που ενεργοποιούν τις AP-1, PI3K (προάγει την ενεργοποίηση των β-κατενίνη και NF-κΒ), NFAT κι επάγουν υψηλότερα επίπεδα IL-8.³⁹ Η μεθυλίωση του *MGMT* γονιδίου επιδιόρθωσης του DNA σχετίζεται επίσης με την CagA στη χρόνια γαστρίτιδα, υποδεικνύοντας το ρόλο της στην επιγενετική ρύθμιση.⁴⁵



Εικόνα 1.6 Σχηματική παράσταση των δομικών περιοχών της CagA. [Bergé & Terradot 2017]³¹

Το H. pylori προκαλεί έναν επιθετικό φαινότυπο στα επιθηλιακά κύτταρα που ομοιάζει με την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT). Πράγματι, η CagA, αφού ενίεται στο κύτταρο ξενιστή, μεταβάλλει τη μορφολογία των επιθηλιακών κυττάρων διακόπτοντας τους διακυτταρικούς συνδέσμους και προκαλώντας απώλεια της κορυφαίας-βασοπλευρικής πολικότητας. Με την αλληλεπίδρασή της με αρκετές πρωτεΐνες των συνδέσμων, συμπεριλαμβανομένων των ΖΟ-1, JAM και Ε-καδερίνη, η CagA διαταράσσει τη συγκρότηση και τη λειτουργία τόσο των στενοσυνδέσμων όσο και των συνδέσμων προσκόλλησης. Η αλληλεπίδρασή της με την Ε-καδερίνη οδηγεί στην απελευθέρωση της β-κατενίνης από το σύμπλοκό της με την Ε-καδερίνη και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του Wnt/β-κατενίνης σηματοδοτικού μονοπατιού. Η απορρύθμιση της β-κατενίνης παίζει καθοριστικό ρόλο στους γαστρεντερικούς καρκίνους κι έχουν περιγραφεί πολυάριθμοι στόχοι αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση του όγκου και τη μετάσταση. Η ανάλυση του φαινοτύπου που μοιάζει με ΕΜΤ των Ηρ μολυσμένων κυττάρων αποκάλυψε ότι η κυτταρική κινητικότητα και επιμήκυνση προκαλούνται μέσω διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Η κυτταρική κινητικότητα και η απώλεια της διακυτταρικής προσκόλλησης είναι ανεξάρτητες από την είσοδο της CagA στα κύτταρα, ενώ η επιμήκυνση του κυττάρου απαιτεί τη μετατόπιση και τη φωσφορυλίωσή της.³²

1.4.2 Η VacA πρωτεΐνη του Helicobacter pylori

Τα γονίδια της VacA απαντώνται σε όλα σχεδόν τα Η. pylori στελέχη που απομονώνονται παγκοσμίως, αλλά παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία. Η VacA κωδικοποιείται από διάφορα αλληλόμορφα που έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή του σήματος (s1/s2), στην ενδιάμεση (i1/i2) που είναι σημαντική για τη δέσμευση στα επιθηλιακά κύτταρα και στη μεσαία περιοχή (m1/m2), όπου εμφανίζονται σε πολλαπλούς συνδυασμούς. Τα αλληλόμορφα vacA s1 και m1 συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο πεπτικού έλκους, ατροφίας και γαστρικού αδενοκαρκινώματος.^{7,22} Η VacA κατηγοριοποιείται ως τοξίνη που σχηματίζει πόρους και κενοτόπια και πολλές από τις δραστηριότητές της συνδέονται με το σχηματισμό διαύλων στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων. Έχει προσδιορισθεί ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται, όπως η επαγωγής της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων, της αυτοφαγίας και η αναστολή του πολλαπλασιασμού.⁷ Η VacA διαταράσσει τον κυτταροσκελετό ακτίνης των επιθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας σε στρογγυλοποίησή τους και απόπτωση. Προκαλεί εισροή του εξωκυττάριου ασβεστίου (Ca²⁺), ακολουθούμενη από ενεργοποίηση της πρωτεάσης καλπαΐνη και επακόλουθη διάσπαση της εζρίνης, ενός ρυθμιστή των νηματίων ακτίνης στις κυτταρικές συνδέσεις, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της από την κορυφαία μεμβράνη και τη διατάραξη της ακτινωτής διάταξης των νηματίων F-ακτίνης στις μικρολάχνες.³² Συμβάλλει στην παθογένεια του Hp ρυθμίζοντας τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς συμμετέχει στην ανάπτυξη ανοχής των δενδριτικών κυττάρων, προάγοντας τη διαφοροποίηση των Treg ευνοώντας την εγκατάσταση του βακτηρίου και την οξειδωτική βλάβη των κυττάρων.^{22,46}



Εικόνα 1.7 Εγκάρσιες τομές γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού).²

Διακρίνονται στο ορατό πεδίο οι κυτταρικές δομές σε κύτταρα (A) απουσία μόλυνσης και (B) 24 h μετά τη μόλυνση από *H. pylori*. 24 h μετά τη μόλυνση είναι έκδηλη η διατάραξη του μονόστιβου επιθηλίου, με διάρρηξη των

διακυτταρικών συνδέσμων και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού φαινοτύπου επιμήκυνσης και διασποράς (φαινότυπος hummingbird) και το σχηματισμό κυτταροσκελετικών δομών ακτίνης (φιλοπόδια, λαμελλοπόδια). Επιπλέον, παρατηρείται η δημιουργία κενοτοπίων. [Παναγιωτοπούλου 2013]²

Φαίνεται πως η VacA αυξάνει την επιλεκτική διαπερατότητα των κυττάρων για ορισμένα μόρια και ιόντα χαμηλού μοριακού βάρους όπως ο σίδηρος (Fe³⁺) και το νικέλιο (Ni²⁺), τα οποία χρησιμοποιεί το βακτήριο ως θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση και την ανάπτυξή του *in vivo*.³² Τα κανάλια της VacA στην πλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών και τοιχωματικών κυττάρων ωφελούν τα βακτήρια απελευθερώνοντας θρεπτικά συστατικά και ουρία, αντίστοιχα, η οποία ουρία επάγει την υποχλωρυδρία.⁸ Η CagA μπορεί να αυξήσει την πρόσληψη τρανσφερίνης διαμέσου της βασοπλευρικής επιφάνειας των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων, ενώ η VacA ανακατευθύνει το εσωτερικοποιημένο σύμπλοκο τρανσφερίνης με τον υποδοχέα της στην κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό, οι CagA και VacA μπορούν να εργαστούν από κοινού για να τροποποιήσουν τη μεταφορά σιδήρου ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μικροαποικιών του *Hp* στην επιθηλιακή επιφάνεια.²²

Μελέτες μεταλλαξογένεσης υποδηλώνουν ότι οι CagA και VacA μπορούν να ρυθμίζουν η μία τις λειτουργίες της άλλης στα επιθηλιακά κύτταρα, πιθανότατα για να αποφευχθεί η υπερβολική βλάβη στα γαστρικά κύτταρα του ξενιστή κατά τη λοίμωξη. Τόσο η CagA όσο και η VacA εντοπίζονται σε λιπιδικές σχεδίες, όπου η CagA συνδέεται με τη GIT1/Cat-1. Η GIT1 είναι μια σημαντική πρωτεΐνη ικριώματος που εμπλέκεται σε μηχανισμούς σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και τη διακίνηση μεμβρανών, επεξεργάζεται κεντρικά τον σχηματισμό φαινοτύπου επιμήκυνσης και διασποράς (φαινότυπος hummingbird) και των κενοτοπίων. Η GIT1 φωσφορυλιώνεται από τις Src και FAK κινάσες, η τελευταία αδρανοποιείται από τη φωσφορυλιωμένη CagA και αποφωσφορυλιώνεται από τον RPTPb υποδοχέα της VacA. Έχει δειχθεί ότι η CagA μειώνει τη φωσφορυλίωση της GIT1 ενώ η σύνδεση της VacA με τον RPTPb την αυξάνει. Επομένως, η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ CagA και VacA μπορεί να δρα μέσω ρυθμιζόμενης από τη GIT1 σηματοδότησης. Μπορεί, επίσης, να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο λοιμοτοξικών παραγόντων δρώντας μέσω σηματοδότησης από τον NFAT, καθώς η CagA αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NFAT μέσω της διέγερσης της καλσινευρίνης. Εντούτοις, οι ιδιότητες του καναλιού της VacA παρεμβαίνουν στην εισροή των ιόντων ασβεστίου που απαιτούνται για τη δράση της καλσινευρίνης, μειώνοντας την ενεργοποίηση του NFAT κι εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των CD4⁺Tλεμφοκυττάρων. Εκτός από τις διαφορικές επιδράσεις στα σηματοδοτικά μονοπάτια, η CagA αναστέλλει την ενδοκυττάρωση της VacA, μειώνοντας την ικανότητά της να σχηματίζει κενοτόπια και να επάγει την απόπτωση.²² Έχει δειχθεί ακόμη πως η υψηλής δραστικότητας VacA αναστέλλει το φαινότυπο διασποράς κι επιμήκυνσης των επιθηλιακών κυττάρων που επάγεται από το Erk/MAPK μονοπάτι που ενεργοποιείται από την CagA.⁴⁷



Εικόνα 1.8 Παθογένεια της Η. pylori λοίμωξης.⁴⁸

Οι αλληλεπιδράσεις των λοιμοτοξικών παραγόντων του βακτηρίου με τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, βλάβη του βλεννογόνου και τελικά τη γαστρική καρκινογένεση. [Τροποποίηση από Conteduca *et al.* 2013]⁴⁸

1.4.3 Άλλοι λοιμοτοξικοί παράγοντες του Helicobacter pylori

Το Hp εκφράζει πρόσθετους βακτηριακούς παράγοντες που σχετίζονται με την παθογένεια της λοίμωξης, όπως η ουρεάση (UreA, UreB) που καταλύει την υδρόλυση της περιβάλλουσας γαστρικής ουρίας σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία διατηρώντας το βακτηριακό μικροπεριβάλλον σε pH συμβατό με την ανάπτυξη και επιβίωση του βακτηρίου. Διάφορες προσκολλητίνες (BabA, SabA, LabA, OipA, AlpA/B, HopQ, HopZ) που θεωρείται ότι προκαλούν μια πιο στενή σύνδεση των βακτηρίων με το επιθήλιο και έτσι ενισχύεται η έκθεσή του σε άλλους λοιμογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση και βλάβη του γαστρικού βλεννογόνου. Η NapA πρωτεΐνη, η οποία είναι χημειοτακτική των ουδετεροφίλων και διεγείρει την παραγωγή ROS, προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών κι επάγει μία ισχυρή Th1 απόκριση.²² Η HtrA εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης που στοχεύει άμεσα και επιλεκτικά την Ε-καδερίνη, διασπώντας το εξωκυτταρικό της τμήμα και διαρρηγνύοντας τους συνδέσμους προσκόλλησης, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των διακυτταρικών συνδέσεων επιτρέποντας την εισχώρηση του Ηρ στις βασοπλευρικές μεμβράνες του πολωμένου επιθηλίου όπου μπορεί να αλληλεπιδρά με διαφορετικούς παράγοντες του ξενιστή, οι οποίοι είναι καθοριστικοί για την εξέλιξη της λοίμωξης.³² Τέλος, η πεπτιδογλυκάνη που ενίεται στα γαστρικά κύτταρα και πυροδοτεί τη NOD1 απόκριση, ενώ σε συνδυασμό με την CagA, ενεργοποιούν τον NF-κB, ο οποίος επάγει την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, ιδιαίτερα των IL- 8 και CCL20.²²

1.5 Φυσική πορεία της *Η. pylori* λοίμωξης

Κατά τη μόλυνση, το *Hp* μεταβαίνει από το γαστρικό αυλό στο βλεννογόνο και με τη βοήθεια των μαστιγίων του φθάνει έως το παχύ στρώμα βλέννας το οποίο καλύπτει και προστατεύει το επιθήλιο του γαστρικού βλεννογόνου. Εκεί, προωθούμενο από τα μαστίγιά του και με τη βοήθεια του ελικοειδούς του σχήματος προσομοιάζει τη σπειροειδή κίνηση κοχλία και διασχίζει τη στιβάδα της βλέννας.¹⁵

Το ανθρώπινο στομάχι είναι ένα αφιλόξενο για τους μικροοργανισμούς περιβάλλον. Η υψηλή οξύτητα (pH 0.8), σε συνδυασμό με την πεψίνη και τη λιπάση, σκοτώνουν τους μικροοργανισμούς που έχουν προσληφθεί με κατάποση. Προκειμένου να εγκατασταθεί το *Hp* ελαχιστοποιεί την έκθεσή του στις θανατηφόρες συγκεντρώσεις οξέος μέσω της βακτηριακής ουρεάσης που εξουδετερώνει τοπικά το όξινο pH. Η οξεία λοίμωξη χαρακτηρίζεται από παροδική υποχλωριδρία, η οποία ευνοεί την επιβίωση του βακτηρίου και την αποίκιση του στομάχου. Η χρόνια λοίμωξη καταλήγει είτε σε υποείτε σε υπερχλωρυδρία, ανάλογα με την ανατομική της θέση. Στην πρώτη περίπτωση, οι περισσότεροι ασθενείς εκδηλώνουν παγγαστρίτιδα (στο σώμα και το θόλο) με μειωμένη έκκριση αξέος που οφείλεται στην επαγόμενη από το *H. pylori*, ειδικότερα από την CagA, καταστολή της έκφρασης της αντλίας Η⁺/K⁺-ΑΤΡάσης των τοιχωματικών κυττάρων, στην εξαρτώμενη από πεσιχωρημένη ατροφική γαστρίτιδα με απώλεια τοιχωματικών κυττάρων και πολυεστιακών περιοχών εντερικής μεταπλασία αναπτύσσεται ο γαστρικός καρκίνος.⁸



Εικόνα 1.9 Μοριακοί μηχανισμοί εγκατάστασης του Η. pylori στο γαστρικό περιβάλλον.¹² Με το ελικοειδές σχήμα και τη σπειροειδή κίνηση το βακτήριο διασχίζει το παχύ στρώμα βλέννας. Τα μαστίγια επιτρέπουν γρήγορη κίνηση και προσανατολισμό προς το στρώμα των επιθηλιακών κύτταρων, με τη μεσολάβηση του TlpB χημειοτακτικού υποδοχέα. Η ουρεάσης εξουδετερώνει το pH. Ειδικά μόρια επιτρέπουν την προσκόλληση του Hp στα επιθηλιακά κύτταρα. Παράγοντες παθογένειας όπως η προσκολλητίνη SabA και η CagA επιτρέπουν την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών από την κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων. Η εδραίωση της φλεγμονής επιτυγχάνεται επίσης με τη στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. [Τροποποίηση από Bauer&Meyer 2011]¹²

Μόνο το 10% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη, κυρίως οι πιο νέοι, εκδηλώνουν δεσπόζουσα (ή καθ' υπεροχήν) γαστρίτιδα του άντρου με αυξημένη έκκριση γαστρικού οξέος, λόγω μείωσης της

έκκρισης σωματοστατίνης και αύξησης της γαστρίνης, που πιθανώς μεσολαβείται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προερχόμενες από το φλεγμονώδες διήθημα (IFN-γ, IL-1β, IL-2 και TNF-α). Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν προδιάθεση για ανάπτυξη πεπτικού έλκους. Η υπεργαστριναιμία μπορεί, επίσης, να διεγείρεται άμεσα από ορισμένες κυτταροκίνες (IL-8 και παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) ή βακτηριακούς παράγοντες (CagL). Με τον καιρό, το *Hp* με τη φλεγμονή μεταναστεύουν εγγύς του άντρου στο θόλο του στομάχου.⁸ Δεδομένου ότι τα μικρόβια που προορίζονται για απομακρυσμένη εντερική αποίκιση πρέπει πρώτα να διέλθουν από το εχθρικό φράγμα του στομάχου, οι μεταβολές που προκαλούνται από το *Hp* στην έκκριση γαστρικού οξέος μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην μικροβιακή ομοιόσταση του εντέρου.⁴⁹

Το φλεγμονώδες περιβάλλον που προκαλείται από τη χρόνια *Hp* λοίμωξη συμβάλλει στην καρκινογένεση μέσω της ενεργοποίησης καταρροϊκών στόχων που ρυθμίζουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου. Στην πραγματικότητα, περίπου 25% όλων των καρκίνων θεωρείται ότι σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι λοίμωξης. Σε καρκίνους που εμφανίζονται σε φλεγμονώδη περιβάλλοντα, η μεταλλαξογένεση και η επιγενετική απορρύθμιση είναι οι κύριοι μηχανισμοί που οδηγούν τα επιθηλιακά κύτταρα προς την καρκινική εξαλλαγή. Αυξημένο φορτίο μεταλλαγών του επιθηλιακού γονιδιώματος εμφανίζεται τόσο λόγω της άμεσης βλάβης του DNA (ROS, RNS) όσο κι εξαιτίας της ανεπαρκούς αποκατάστασης των μεταλλάξεων πριν από την αντιγραφή του DNA (μειωμένη λειτουργία των MGM και MMR γονιδίων). Η *Hp* λοίμωξη οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή, συσσώρευση ROS και οξειδωτική βλάβη στο DNA των κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου και σχετίζεται επίσης με ανώμαλη μεθυλίωση ενός αριθμού γονιδίων, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στη γαστρική καρκινογένεση.⁵⁰



Εικόνα 1.10 Η επαγόμενη από το Η. pylori αναστολή της έκκρισης οξέος. [Smolka&Schubert 2017]⁸

Σχηματική παρουσίαση ενός γαστρικού τοιχωματικού κυττάρου που δείχνει το T4SS του *Hp* να αλληλεπιδρά με την α5β1 ιντεγκρίνη στη βασοπλευρική μεμβράνη διευκολύνοντας τη μεταφορά της CagA και του GM-3 γλυκοσυλιωμένου τριπεπτιδίου στο τοιχωματικό κύτταρο. Η επακόλουθη ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης στα κύτταρα του ξενιστή επιστρατεύει p50 ομοδιμερή του NF-κB στον πυρήνα που έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή μεταγραφής του γονιδίου της α υπομονάδας της H⁺/K⁺-ATPάσης. Η αλληλεπίδραση του *Hp* με την ιντεγκρίνη του κυττάρου-ξενιστή ενεργοποιεί επίσης την ADAM17, οδηγώντας στην επαγωγή και δέσμευση του HB-EGF στον EGFR υποδοχέα και στη συνεργιστική επιστράτευση του NF-κB που μεσολαβείται από την ERK.⁸ (sc, εκκριτικό κανάλι)

Πράγματι, αρκετοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως οι TNF-α, IL-1β και ROS, εμπλέκονται στην ανώμαλη μεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια της γαστρικής καρκινογένεσης. Η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζεται από την DNMT οικογένεια και περιλαμβάνει την υπερμεθυλίωση γενικά, αλλά και αυτή των CpG νησίδων που περιορίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές των ανθρώπινων γονιδίων. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων σε περιοχές υποκινητή προκαλεί την αποσιώπηση του γονιδίου, ενώ η μεθυλίωση στην κωδική περιοχή συσχετίζεται συνήθως με αυξημένη μεταγραφή του. Έτσι, στους καρκίνους εμφανίζεται τοπική υπερμεθυλίωση των υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γενική υπομεθυλίωση άλλων υποκινητών. Η εκτεταμένη επιγενετική τροποποίηση στο περιβάλλον του φλεγμένοντος βλεννογόνου γεφυρώνει την *Hp*-γαστρίτιδα με το γαστρικό καρκίνο. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων εμφανίζεται νωρίς στη γαστρική καρκινογένεση, επηρεάζοντας γονίδια όπως των MLH1, p14, p15, p16, CDKN2A, CDH1, LOX, APC, RUNX3, THBS1, TIM3, COX-2 και MGMT παραγόντων. Η γαστρική καρκινογένεση περιλαμβάνει σταδιακή συσσώρευση διαφόρων γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι γενετικές μεταβολές, όπως οι μεταλλάξεις στις p53, KRAS, PIK3CA και MLL, καθώς και οι ενισχύσεις των PIK3CA, C-MET, ERBB4 και CD44 εμφανίζονται συχνά στο γαστρικό καρκίνο.⁵⁰



Εικόνα 1.11 Χαρακτηριστικά της Η. pylori λοίμωξης. [Τροποποίηση από Bauer & Meyer 2011]¹² (α) Ανατομία του ανθρώπινου στομάχου. (β) Εντόπιση του πεπτικού έλκους (γαστρικό & δωδεκαδακτυλικό) και του μη-καρδιακού γαστρικού καρκίνου. (γ) Διαφορές στην έκβαση, πολλαπλασιασμό, φλεγμονή, έκκριση οξέος και στον κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου.

Από μορφολογική άποψη, ο γαστρικός καρκίνος είναι πολύ ετερογενής, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην ποικιλομορφία των ιστοπαθολογικών ταξινομήσεων.⁹ Η πιο διαδεδομένη ταξινόμηση προτάθηκε από τον Lauren, κατά τον οποίο ο γαστρικός καρκίνος διαιρείται σε δύο κύριους τύπους, τον εντερικό και το διάχυτο, οι οποίοι διαφέρουν κλινικά και επιδημιολογικά.⁵¹ Οι ασθενείς με όγκους διάχυτου τύπου είναι κυρίως νεότερα άτομα, παρουσιάζουν σχεδόν ίση αναλογία φύλου και φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση από εκείνους με όγκους εντερικού τύπου είναι κυρίως νεότερα άτομα, παρουσιάζουν σχεδόν ίση αναλογία φύλου και φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση από εκείνους με όγκους εντερικού τύπου.⁹ Ο Correa πρότεινε ένα μοντέλο γαστρικής καρκινογένεσης σύμφωνα με το οποίο το καρκίνωμα εντερικού τύπου αντιπροσωπεύει το τελικό προϊόν μιας σειράς διαδοχικών μεταβολών στο γαστρικό βλεννογόνο, περιλαμβανομένης της επιπολής γαστρίτιδας, της χρόνιας ατροφικής ή πολυποειδούς αδενωματώδους δυσπλασία.^{52,53} Η αλληλουχία των ιστογενετικών αλλαγών που οδηγούν σε διάχυτου τύπου καρκίνο είναι λιγότερο καθορισμένη. Ένα σημαντικό κλάσμα γαστρικών καρκίνων χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη μορφολογικών χαρακτηριστικών τόσο του εντερικού όσο και του διάχυτου τύπου.⁹

1.6 Ανοσοαπόκριση έναντι της *Η. pylori* λοίμωξης & Ανοσοδιαφυγή

Παρά το γεγονός ότι το *Hp* προκαλεί ισχυρές ανοσολογικές αντιδράσεις, κατά τη διάρκεια της συνεξέλιξής του με τον άνθρωπο έχει αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για να διαφεύγει του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και να παραμένει στον εχθρικό γαστρικό θώκο. Η ανοσοδιαφυγή και η εμμένουσα λοίμωξη εξαρτώνται από πολλούς λοιμοτοξικούς βακτηριακούς παράγοντες οι οποίοι αφενός προκαλούν κυτταρική βλάβη και στρατολόγηση ανοσοκυττάρων στο σημείο της λοίμωξης και αφετέρου υπονομεύουν τις ανοσοαποκρίσεις του ξενιστή προκειμένου να δημιουργήσουν ένα ανεκτικό περιβάλλον επιτρέποντας στο βακτήριο να επιβιώνει.⁵⁴ Το υψηλό επίπεδο ποικιλομορφίας του *Hp* όχι μόνο υποστηρίζει την προσαρμογή του στον ξενιστή, αλλά ταυτόχρονα του επιτρέπει να διαφεύγει της ανοσοεπιτήρησης.⁵⁵ Η ανοσία δεν φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά την εγκατάσταση της λοίμωξης, καθώς ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς δεν επιδεικνύουν υψηλότερη βακτηριακή πυκνότητα⁵⁶, ενώ η λοίμωξη επάγει πάντοτε φλεγμονή, ανεξάρτητα από το αν υπάρχουν ή όχι συμπτώματα⁵⁷. Το *Hp* μπορεί να παραμείνει στο στομάχι σε υψηλή πυκνότητα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, υποδεικνύοντας ότι η ανοσοαπόκριση του ξενιστή δεν είναι αποτελεσματική στην εξάλειψή του.⁵⁴

Η ανοσοαπόκριση περιλαμβάνει τόσο έμφυτα συστατικά (επιθηλιακά, ουδετερόφιλα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα) όσο και προσαρμοστικά (Β και Τ λεμφοκύτταρα). Η έμφυτη ανοσοαπόκριση σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκκρισης οξέος από τα τοιχωματικά κύτταρα. Η έκκριση IL-8 από επιθηλιακά κύτταρα που οφείλεται στην παρουσία του Hp, προκαλεί χημειοτακτική στρατολόγηση ουδετερόφιλων και μακροφάγων στον αδενικό βλεννογόνο, όπου και απελευθερώνουν IL-1β η οποία πιθανώς αναστέλλει την έκκριση οξέος.⁸ Επιπλέον, η αποστέρηση της χαληστερόλης από τα κύτταρα και η ενσωμάτωσή της στη μεμβράνη του Ηρ και η διαδοχική γλυκοζυλίωσή της, καθώς και η κάλυψη του βακτηρίου με μόρια του ξενιστή, όπως το πλασμινογόνο, πιθανόν αποτελούν μηχανισμούς αντιγονικής διαφυγής.⁵ Αν και το *Ηp* θεωpείται γενικά ως ένα εξωκυττάριο παθογόνο, ορισμένα στοιχεία υποστηρίζουν ότι ένα μικρό κλάσμα του βρίσκεται εντός των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, όπου μπορεί να αντιπροσωπεύει τη θέση παραμονής του κατά την εμμένουσα λοίμωξη.⁵⁸ Η αυτοφαγία αποτελεί μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκριση κατά του Ηρ, ελαττώνοντας την επιβίωσή του κι έχει δειχθεί ότι το βακτήριο μπορεί να προκαλέσει αυτοφαγία στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, παρά το γεγονός ότι εξακολουθεί να αναπαράγεται εντός των αυτοφαγοσωμάτων. 59,60

Κατά τη μόλυνση, το *Hp* έρχεται σε επαφή με το γαστρικό επιθήλιο και τους υποδοχείς του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος κι έχει υιοθετήσει μηχανισμούς είτε για να κρύψει είτε να τροποποιήσει τα δυνητικά ανοσογόνα συστατικά του. Οι TLR και NLR υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα, αντίστοιχα, τόσο σε ανοσοκύτταρα όσο και σε μη-ανοσοκύτταρα (γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα), αντιπροσωπεύουν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων παραγόντων. Η πεπτιδογλυκάνη που ενίεται από το βακτήριο στο κύτταρο-ξενιστή επάγει αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις διαμεσολαβούμενες από τον ενδοκυττάριο υποδοχέα NOD1.³⁰ Η αναγνώριση από τους TLR και NLR υποδοχείς οδηγεί στη στρατολόγηση μιας ευρείας ποικιλίας φλεγμονωδών κυττάρων και μεσολαβητών και στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB και AP-1) που διαμεσολαβούν στην έμφυτη ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε απόκριση στο βακτήριο αυξάνει την παραγωγή ROS και RNS, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο κύτταρο και στο DNA, ευνοώντας την εμφάνιση μεταλλάξεων που μπορούν να διευκολύνουν την καρκινογόνο διαδικασία.⁶¹

Οι TLRs ανήκουν σε μια κατηγορία υποδοχέων, TLR1-10 στον άνθρωπο, είναι γνωστοί ως υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) που ανιχνεύουν σχετικά με παθογόνα μοριακά πρότυπα

(PAMP) κι εκφράζονται τόσο στις κυτταρικές επιφάνειες όσο και ενδοκυτταρικά. Τα PAMPs μπορεί να προέρχονται από μία ευρεία σειρά μορίων όπως λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και ειδικές πρωτεΐνες που προέρχονται από μικροοργανισμούς. Με τη σύνδεση του μικροβιακού προσδέτη, οι TLRs διμερίζονται και μόρια προσαρμογέων (MyD88 ή TRIF) δημιουργούν σύμπλοκα με την κυτταροπλασματική περιοχή του Toll/IL-1 υποδοχέα (TIR). Η ενεργοποίηση των TLRs επάγει καταρράκτες σηματοδότησης που τελικά οδηγούν στη μεταγραφή τόσο προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών όσο και ιντερφερονών τύπου Ι.³⁰

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αναγνωρίζεται από το TLR4-MD2 ανοσοσύμπλοκο μέσω του λιπιδίου Α. Όμως, το Ηρ μεταβάλλει τον LPS του διαθέτοντας μοναδικές τροποποιήσεις στο λιπίδιο Α. Επιπλέον, το Ο-αντιγόνο της εξώτατης περιοχής του LPS διαθέτει αντιγόνα Lewis, τα οποία μιμούνται τα ομώνυμα αντιγόνα του ξενιστή που εκφράζονται στην κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου και εντός των αδένων του άντρου και του σώματος. Το Ηρ μπορεί να διαφεύγει της ανοσολογικής ανίχνευσης μέσω αυτού του μοριακού μιμητισμού ο οποίος συμμετέχει, επιπλέον, σε αυτοάνοσες αποκρίσεις. Ο TLR5 εκφράζεται στο γαστρικό επιθήλιο και ο φυσικός του προσδέτης είναι η φλαγγελίνη των μαστιγίων. Ωστόσο, η φλαγγελίνη του Ηρ δεν αναγνωρίζεται από τον TLR5, λόγω μετάλλαξης στη συντηρημένη περιοχή της FlaA. Ο TLR9 είναι συνδεδεμένος με ενδοσώματα διαμεμβρανικός υποδοχέας που ανιχνεύει παθογόνα DNA. Στην Ηρ λοίμωξη έχει δειχθεί πως ο TLR9 ενεργοποιείται απ' ευθείας από το cagT4SS και η ενεργοποίησή του επάγει προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και αντιφλεγμονώδεις (μέσω της IL-10) κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της λοίμωξης, μεσολαβούμενες από IFN-γ. Η ενεργοποίηση της TLR9 σηματοδότησης φαίνεται πως έχει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα στις πρώτες φάσεις της λοίμωξης, με μειωμένη διείσδυση ουδετεροφίλων και μειο-ρύθμιση της έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IFNγ. Με την εξέλιξη της λοίμωξης, σε ένα φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον στο οποίο τα κύτταρα έχουν χάσει την πολικότητα τους, ο TLR9 μπορεί να πυροδοτήσει προ-φλεγμονώδεις καταρράκτες που επάγουν την καρκινογένεση. Μελέτες που διερευνούν τον ρόλο του TLR9 στο γαστρικό καρκίνο υποδηλώνουν ότι είναι αυξο-ρυθμισμένος στον καρκινικό ιστό και πιθανώς διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου.³⁰

Το *Hp* έχει επίσης αναπτύξει στρατηγικές χειραγώγησης της TLR σηματοδότησης παρεμποδίζοντας τις προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η ενεργοποίηση του TLR2 επάγει την έκφραση πολλών αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω του MyD88, όπως των IL-10 και IL-17 και της Foxp3 που ενισχύει την παραγωγή των Treg και μειώνει τα επίπεδα της IFN-γ. Τέλος, το *Hp* μπορεί να επάγει την έκφραση της Cox2 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα με τρόπο που εξαρτάται από το TLR2/TLR9 ετεροδιμερές. Η TLR2/TLR9 σηματοδότηση επάγει τις MAPK κινάσες και ακολούθως επιτρέπει σε μεταγραφικούς παράγοντες να δεσμεύονται και στις δύο θέσεις CRE και AP-1 εντός του υποκινητή της Cox2. Ως αποτέλεσμα της έκφρασης της Cox2, απελευθερώνεται προσταγλανδίνη E2 η οποία προάγει τον κυτταρικό ποπλλαπλασιασμό, τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση.³⁰

Ως μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης, τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν έναν αριθμό αντιμικροβιακών πεπτιδίων (defensin) για την προστασία του γαστρεντερικού επιθηλίου από τα εισβάλλοντα βακτήρια. Έχει αναφερθεί ότι το *Hp* επάγει την έκφραση των hBD2, hBD3 και LL37 τα οποία παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δραστικότητας. Φαίνεται, ωστόσο, ότι το *Hp* ρυθμίζει την έκφραση αυτών των αντιμικροβιακών ουσιών προκειμένου να διαφύγει της ανοσοεπιτήρησης. Έτσι, στα αρχικά στάδια της λοίμωξης επάγεται ταχέως η έκφραση του hBD3 μέσω εξαρτώμενης από τον EGFR ενεργοποίησης της MAPK κινάσης και της JAK-STAT σηματοδότησης. Κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης, όμως, το hBD3 μειο-ρυθμίζεται μέσω μεσολαβούμενης από τον hBD1 μέσω της NF-κB σηματοδότησης και η μειο-ρύθμιση αυτή συσχετίζεται με υψηλότερη

βακτηριακή πυκνότητα και φλεγμονή. Τέλος, τα hBD3 και LL37 φαίνεται πως εξουδετερώνουν αποτελεσματικά το *Hp*, τα οποία όμως ανιχνεύονται οριακά στο στομάχι κατά τη λοίμωξη.⁵⁴



Εικόνα 1.12 Ανοσοδιαφυγή του Η. pylori από την έμφυτη ανοσοαπόκριση του ξενιστή.⁵⁴ Κατά την Ηρ λοίμωξη, τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες οι οποίες επάγουν την προσέλευση αρκετών τύπων ανοσοκυττάρων στο γαστρικό βλεννογόνο. Ωστόσο, το βακτήριο έχει αναπτύξει μια σειρά από στρατηγικές για να διαφεύγει της αναγνώρισης και να εμποδίζει τις ανοσοαντιδράσεις. Οι LPS και φλαγγελίνη του Hp αναγνωρίζονται ασθενώς από τους TLR λόγω δομικών τροποποιήσεων και η δράση της CagA μποκάρει την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (defensins) από τα επιθηλιακά κύτταρα. Το T4SS αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση του βακτηρίου, ενώ σε περίπτωση φαγοκυττάρωσής του, αυτό μπορεί να αντισταθεί στην ενδοκυτταρική θανάτωση, καθώς τα βακτηριακά ένζυμα καταλάση και αργινάση αναστέλλουν την παραγωγή ROS και NOS. Η ενεργοποίηση του δείκτη DC-SIGN στα δενδριτικά κύτταρα (DC) καταστέλλει τις προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις και με την τροποποίηση της ωρίμανσης και της λειτουργίας τους μέσω των CagA, VacA και GGT, προάγεται η Treg κυτταρική απόκριση. [Τροποποίηση από Mejías-Luque & Gerhard 2017]⁵⁴

Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τη δεύτερη γραμμή άμυνας, ανιχνεύοντας τα συστατικά του *Hp* μέσω των TLR και NLR. Οι TLR στην κυτταρική μεμβράνη των DC ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδότησης στο κύτταρο ξενιστή υπεύθυνο για την έναρξη της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή προάγοντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1β, IL-6 και TNF-α προκειμένου να καταρτίσουν την T και B λεμφοκυτταρική προσαρμοστική ανοσία. Πράγματι, ο TNF-α συμβάλλει στην ωρίμανση των μονοκυττάρων, η IL-6 υποστηρίζει τη μετάβαση μεταξύ των πρώιμων σταδίων της λοίμωξης και της παρατεταμένης εισροής μονοπύρηνων στο μολυσμένο γαστρικό βλεννογόνο και η IL-1β συμβάλλει στην ενεργοποίηση του NF-κB.⁵⁴

Η ενεργοποίηση του NF-κB και η παραγωγή κυτταροκινών προάγουν τη στρατολόγηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων, την ενεργοποίηση των μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων (DCs) και τη διαπίδυση των λεμφοκυττάρων στο βλεννογόνων. Σε αυτή τη φάση εκκρίνονται IL-8 και IL-10 από τα ουδετερόφιλα, IL-1β, IL-6, IL-10 και IL-12p40 (μερικώς εκκρινόμενη ως IL-23) από τα μονοκύτταρα, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 και IL-23 από τα δενδριτικά κύτταρα και IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40 και IL-23 από τα Μ1 μακροφάγα. Τα Μ2 μακροφάγα συνθέτουν την IL-10 αλλά

παράγουν λιγότερες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες από τα M1, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μια χρόνια φλεγμονώδη απόκριση.^{62,63} Ο NF-κB έχει αναγνωριστεί ως πιθανή μοριακή γέφυρα μεταξύ της φλεγμονής και του καρκίνου, επειδή η αλόγιστη ενεργοποίησή του επάγει αρκετά γονίδια-στόχους με φλεγμονώδεις (COX-2, IL-1, IL-6, IFN-γ, iNOS, TNF-α, TRAF5, TRAF2, RIP, TAK1, ΙΚΚβ), αντι-αποπτωτικές, (cIAP-1,-2, XIAP, Bcl-2, Bcl-3, Bcl-xL), ρυθμιστικές του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1) και προ-αγγειογενετικές (VEGF, αγγειοποιητίνη) λειτουργίες ή/και αναστέλλει αποπτωτικά γονίδια (p53, Bax, Bad), συμβάλλοντας έτσι στην ογκογένεση.⁵⁰

Το *Hp* έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για να αναστέλλει τη φαγοκυττάρωσή του, αλλά ακόμη και στην περίπτωση που φαγοκυτταρωθεί, διαφορετικές στρατηγικές του επιτρέπουν να επιβιώνει. Τα *cagPAI*+ και *vacA*+ στελέχη έχει βρεθεί ότι καθυστερούν τον πολυμερισμό της ακτίνης και το σχηματισμό φαγοσωμάτων στα μακροφάγα ή επάγουν την απόπτωσή τους. Αφού σχηματίζονται, τα φαγοσώματα συντήκονται σε μεγασώματα μέσα στα οποία το *Hp* αντιστέκεται στην ενδοκυτταρική θανάτωση. Η παραγωγή NO από τα μακροφάγα αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό για τη θανάτωση των βακτηρίων, όμως η ουρεάση του *Hp* επάγει την ενεργοποίηση της iNOS, ενώ ταυτόχρονα, η αργινάση του το προστατεύει από το NO, καθώς ανταγωνίζεται με την iNOS του κυττάρου-ξενιστή για το κοινό τους υπόστρωμα, την L-αργινίνη. Η επιβίωσή του στα ουδετερόφιλα επιτυγχάνεται επιπλέον, με το μπλοκάρισμα του συστήματος οξειδάσης του NADPH, η οποία παράγει ROS σε απόκριση στο βακτήριο. Η συγκρότηση της NADPH οξειδάσης είναι αναποτελεσματική στο φαγόσωμα και παρόλο που τα ουδετερόφιλα που περιέχουν *Hp* παράγουν ROS, αυτές δεν συσσωρεύονται μέσα στα φαγοσώματα αλλά απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Το *Hp* παράγει καταλάση και δισμουτάση του υπεροξειδίου, οι οποίες αποτοξινώνουν τις ROS και το προστατεύουν από τις τοξικές τους επιδράσεις.⁵⁴



Εικόνα 1.13 *Το Η. pylori επάγει ανεκτικά δενδριτικά κύτταρα (DC).* [Mejías-Luque & Gerhard 2017]⁵⁴ Το *Hp* επηρεάζει την ωρίμανση και λειτουργία των DC οδηγώντας σε έναν ανεκτικό φαινότυπο. Η είσοδος της CagA στα DC επιβραδύνει την ωρίμανσή τους, τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα MHC-II, τον δείκτη ωρίμανσης CD83, καθώς και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86. Επιπροσθέτως, επάγει υψηλά επίπεδα έκφρασης της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, η οποία ενεργοποιεί το STAT3 μειώνοντας την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της IL-12p70 (IL-23). Επιπλέον, η CagA ενεργοποιεί την SHP-2 οδηγώντας σε αναστολή της μετατόπισης της IRF3 στον πυρήνα και της επακόλουθης έκφρασης της ιντερφερόνης. Λόγω της ενζυμικής δράσης της GGT (γ-γλουταμυλτρανσφεράση) του *Hp*, η γλουταμίνη (Gln) μετατρέπεται σε γλουταμικό (Glu) που μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς του που εκφράζονται στα DCs. Αυτό οδηγεί σε αναστολή της CAMP σηματοδότησης και της έκφρασης της IL-6.⁵⁴ (C: καταλυτικό τμήμα, R: ρυθμιστικό) Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, βασικοί μεσολαβητές της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης, καθώς ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των Τ κυττάρων. Τα DC μπορούν να εισέλθουν στο γαστρικό επιθήλιο, όπου προσλαμβάνουν το *Hp* και τα κυτταρικά του υπολείμματα και με τον τρόπο αυτό διαμορφώνουν την προσαρμοστική ανοσοαπόκριση. Οι C-τύπου λεκτίνης υποδοχείς (CLR) που εκφράζονται στα δενδριτικά κύτταρα αναγνωρίζουν και δεσμεύουν υδατάνθρακες όπως μαννόζη, φουκόζη ή γλυκάνη που συνήθως εκφράζονται στα βακτηριακά κυτταρικά τοι αλληλεπίδραση αυτή εμποδίζει την ανάπτυξη των Th1 κυττάρων επάγοντας μια αντιφλεγμονώδη ανοσοαπόκριση. Ακόμη, το *Hp* έχει αναπτύξει μια σειρά από στρατηγικές για τη χειραγώγηση της ωρίμανσης των DC και την παραγωγή κυτταροκινών προάγοντας έναν φαινότυπο ανοχής που καθοδηγεί μια Treg απόκριση. Οι μηχανισμοί αυτοί συνεισφέρουν στη βακτηριακή ανοσοδιαφυγή.⁵⁴



Εικόνα 1.14 *Το Η. pylori αναστέλλει τις αποτελεσματικές αποκρίσεις των Τ κυττάρων-τελεστών.*⁵⁴ Η λειτουργικότητα των Τ κυττάρων μεταβάλλεται από τους λοιμοτοξικούς παράγοντες του *Hp*. Η VacA δεσμεύεται στη β2 υπομονάδα της ιντεγκρίνης του LFA-1 υποδοχέα, η οποία ενδοκυτταρώνεται μετά από φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης της κυτταροπλασματικής της ουράς από την PKC, διευκολύνοντας την πρόσληψη της δεσμευμένης VacA. Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα προλαμβάνει την πυρηνική μετατόπιση του NFAT παρεμβαίνοντας στο σύστημα καλμοντουλίνης/καλσινευρίνης (CaM/Cn). Αυτό οδηγεί σε εξασθενημένη παραγωγή IL-2 και αναστολή ενεργοποίησης των Τ κυττάρων. Η GGT (γγλουταμυλτρανσφεράση) επίσης παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων με τη στέρηση γλουταμίνης (Gln) εμποδίζοντας την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων σημαντικών για τον επαναπρογραμματισμό των Τ κυττάρων, όπως των c-Myc και IRF4. Τέλος, η αργινάση του *Hp* συμβάλλει επίσης στη διακοπή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων με την εξάντληση της L-αργινίνης, η οποία απαιτείται για την ενεργοποίησή τους. [Mejías-Luque & Gerhard 2017]⁵⁴

Στις πρώτες αναφορές έγινε λόγος για αδιευκρίνιστους εκκριτικούς παράγοντες του *Hp* που αναστέλλουν την έκκριση της IL-12, ενώ η χρόνια έκθεση στο βακτήριο είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση του PD-L1, μέλος της οικογένειας B7 που εμπλέκεται στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των T κυττάρων και την εξασθένιση της λειτουργίας των DC, παρεμποδίζοντας την Th1 απόκριση. Περαιτέρω έρευνες ενέπλεξαν τις CagA, VacA, και GGT (γ-γλουταμυλτρανσφεράση) στα *Hp*επαγόμενα ανεκτικά αποτελέσματα επί των DCs. H CagA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των δενδριτικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών (BMDCs) και στην αναστολή διαφοροποίησης των CD4⁺ T κυττάρων προς τον Th1 φαινότυπο. Ως εκ τούτου, η φωσφορυλίωση της CagA και η επακόλουθη ενεργοποίηση της SHP-2, καταστέλλει τις TBK-1 και IRF-3 με αποτέλεσμα τη
μειωμένη παραγωγή ιντερφερόνης από τα DCs. Η CagA επάγει έναν ημι-ώριμο DC φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση του συνδιεγερτικού μορίου CD86 και του δείκτη ωρίμανσης CD83 καθώς και από χαμηλή έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-12p70 και αυξημένη έκφραση της IL-10, η οποία προάγει μία Treg απόκριση. Αυτές οι αλλαγές ενορχηστρώνονται από την εξαρτώμενη από IL-10 ενεργοποίηση της STAT3. Οι VacA και GGT βακτηριακοί παράγοντες είναι επίσης σημαντικοί για την ανάπτυξη ενός κυρίαρχου Treg φαινοτύπου. Η VacA φαίνεται να αναστέλλει την ωρίμανση των DC μέσω επαγωγής του E2F1, ενός κρίσιμου καταστολέα της ωρίμανσης των DC. Η GGT επάγει επίσης έναν ανεκτικό φαινότυπο κυρίως καταστέλλοντας την έκφραση της IL-6. Αυτή η επίδραση οφείλεται στην ενζυμική δραστικότητα της GGT, η οποία μετατρέπει τη γλουταμίνη σε γλουταμικό, που με τη σειρά του, μέσω των υποδοχέων του που εκφράζονται στα DCs, αναστέλλει τη μεσολαβούμενη από cAMP ρύθμιση της έκφρασης της IL-6, προάγοντας έτσι την επέκταση των Τρυθμιστικών κυττάρων.⁵⁴

Η προσαρμοστική ανοσοαπόκριση έναντι του *Hp* χαρακτηρίζεται από τη στρατολόγηση των CD4⁺ T κυττάρων-τελεστών, ιδιαίτερα των Th1 και Th17, τα οποία είναι κρίσιμα για τον έλεγχο της λοίμωξης και συγχρόνως εμπλέκονται στις ανοσοπαθολογικές αλλαγές που προκύπτουν από τη χρόνια λοίμωξη. Οι κυτταροκίνες των Th διεγείρουν την παραγωγή χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα οι οποίες οδηγούν στην έκκριση ROS και RNS από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα.⁵⁴ Oι υδροξυλικές ρίζες αυξάνουν την έκκριση IL-8 που με τη σειρά της διεγείρει τη γαστρίνη με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση στης έκκρισης οξέος και η έκθεση των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων στο ίδιο το υδροχλωρικό οξύ (HCI) προκαλεί παραγωγή υπεροξειδίου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο στη συνέχεια πυροδοτεί την κυτταρική απόπτωση.⁸ Η παραγωγή αυτών των μεσολαβητών της φλεγμονής, η οποία διαφορετικά θα δημιουργούσε ένα δυσμενές περιβάλλον για την εγκατάσταση του *Hp*, αντισταθμίζεται από τις αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις ενός επαγόμενου από το *H. pylori* Treg υποτύπου που εκφράζει την FOXP3, ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την ανάπτυξη των Treg και αυξάνει τα επίπεδα των IL-10 και TGF-β1 στο βλεννογόνο.⁵⁴

Οι VacA και GGT παρεμποδίζουν τις αποτελεσματικές Τ κυτταρικές αποκρίσεις κατά τη λοίμωξη, ενώ, και άλλοι βακτηριακοί παράγοντες όπως η αργινάση και το *cagPAI* συμβάλλουν επίσης στην απόσβεση του πολλαπλασιασμού και της λειτουργίας των Τ κυττάρων. Η VacA μπορεί να αλληλεπιδρά με τα Τ κύτταρα στη βασική μεμβράνη και να διεισδύει σε ενεργοποιημένα Τ κύτταρα με δέσμευση στη β2 ιντεγκρίνη (CD18), η οποία με το CD11a σχηματίζουν τον ετεροδιμερή διαμεμβρανικό υποδοχέα LFA-1. Η πρόσληψη της VacA διευκολύνεται από τη φωσφορυλίωση της β2 ιντεγκρίνης από την PKC. Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, η VacA υποβαθμίζει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Παρεμβαίνει στο TCR-IL-2 μονοπάτι σηματοδότησης στο επίπεδο της καλσινευρίνης αναστέλλοντας την πυρηνική μετατόπιση του NFAT, ο οποίος ενεργοποιεί γονίδια ειδικά της Τ κυτταρικής απόκρισης. Με τον τρόπο αυτόν, καταστέλλεται η μεσολαβούμενη από την IL-2 προώθηση του κυτταρικού κύκλου και ο πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, χωρίς να επηρεάζεται η εξαρτώμενη από την IL-2 επιβίωσή τους. Η VacA είναι απαραίτητη για το σχηματισμό στη μεμβράνη εκλεκτικών διαύλων ανιόντων που αναστέλλουν την κλωνική επέκταση των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των Τ κυττάρων επηρεάζεται επίσης από τη μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της VacA, ενώ οι αναδιατάξεις της ακτίνης μέσω των ΜΑΡ κινασών ΜΚΚ3/6 και p38 και των Ras σχετιζόμενων Rac/Vav, ελαττώνουν την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Η VacA έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό τόσο των $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ όσο και των Β-λεμφοκυττάρων.⁵⁴

Η GGT επίσης παρεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των Τ κυττάρων, μπλοκάροντας άμεσα τον πολλαπλασιασμό τους με διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 μέσω διατάραξης του Ras μονοπατιού σηματοδότησης. Πρόσφατα, απεδείχθη ότι η GGT υπονομεύει τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των Τ λεμφοκυττάρων, στερώντας τους τη γλουταμίνη. Η

έκφραση των IL-2, CD25, IFN-γ και IL-17 μειώνεται παρουσία GGT. Επιπλέον, η έκφραση των c-Myc και IRF4 μεταγραφικών παραγόντων και οι καταρράκτες σηματοδότησης ως μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης (mTOR) σημαντικοί για το μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των T κυττάρων μεταβάλλονται από τη GGT, υποδεικνύοντας ότι η ενζυμική της δραστικότητα είναι επαρκής για να εμποδίσει τις T κυτταρικές αποκρίσεις. Η L-αργινίνη απαιτείται για την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των T κυττάρων και εξαντλείται από την αργινάση του *Hp* κατά την παραγωγή ουρίας. Αυτό προκαλεί μειωμένο πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και μειωμένη έκφραση της κύριας CD3f-αλυσίδας μεταγωγής σήματος του TCR, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή τους. Τα *Hp cagPAI*⁺ στελέχη βρέθηκαν να επάγουν απόπτωση των T κυττάρων μέσω της επαγωγής του FasL, περιορίζοντας την ανοσία του ξενιστή. Σε τελική ανάλυση, η αναστολή των T κυττάρων-τελεστών σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μιας Treg προσαρμοστικής ανοσολογικής επιτήρησης και επιμένει ακόμη και αν προκαλεί ισχυρές φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

1.7 Εκρίζωση του Helicobacter pylori

Η επίδραση της εκρίζωσης του *Hp* στη μείωση της επίπτωσης του γαστρικού καρκίνου πιστεύεται ότι σχετίζεται με τον κίνδυνο που υπήρχε κατά το χρόνο της θεραπείας.⁶⁴ Μια συστηματική ανασκόπηση έδειξε ότι η ατροφική γαστρίτιδα μπορεί να υποτροπιάσει μέσα σε ένα ή δύο χρόνια μετά την επιτυχή εκρίζωση του *Hp*.¹⁴ Ωστόσο, η υποτροπή της ατροφικής γαστρίτιδας μετά την εκρίζωση του βακτηρίου φαίνεται να εξαρτάται από το μέγεθος και την ανατομική κατανομή της ατροφίας, με μια μεταγενέστερη μετα-ανάλυση να υποδεικνύει ότι οι μεταβολές της γαστρικής ατροφίας θα μπορούσαν να είναι αντιστρεπτές μόνο σε περιπτώσεις που βρίσκονται στο σώμα, αλλά όχι στο άντρο.⁶⁵ Η εντερική μεταπλασία είναι ένα λιγότερο αναστρέψιμο στάδιο από ό,τι η ατροφία, με μετα-αναλύσεις να υποδηλώνουν ότι η εκρίζωση στο στάδιο της εντερικής μεταπλασίας είναι λιγότερο αποτελεσματική και πιο πιθανό να εξελιχθεί σε γαστρικό καρκίνο.⁶⁵

Η χαμηλότερη *Hp* βακτηριακή πυκνότητα σε περιοχές με εντερική μεταπλασία μπορεί να εξηγήσει γιατί το πλεονέκτημα της εξάλειψης είναι πιο περιορισμένο σε αυτό το στάδιο. Ωστόσο, ακόμη κι αν η εκρίζωση του βακτηρίου δε μπορεί να αναστρέψει την εντερική μεταπλασία, μπορεί να είναι ευεργετική για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με εκτεταμένη εντερική μεταπλασία, όπως προτάθηκε σε μια ιαπωνική πολυκεντρική μελέτη που έδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης νέων καρκίνων μειώθηκε κατά το ένα τρίτο εκείνων με εκρίζωση του *Hp* σε σύγκριση με εκείνους χωρίς θεραπεία.⁶⁶ Παρόλα αυτά, ο γαστρικός καρκίνος εξακολουθεί να εμφανίζεται επί εδάφους εντερικής μεταπλασίας ακόμη και μετά την εκρίζωση του *Hp* και δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την επίδραση της εκρίζωσης στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου σε περιπτώσεις εκτεταμένης εντερικής μεταπλασίας, αν και φαίνεται να μειώνει την εξέλιξή της.⁵⁰ Τέλος, η ανώμαλη μεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών που παρατηρείται στην *Hp*-γαστρίτιδα και στο γαστρικό καρκίνο έχει αποδειχθεί ότι είναι εν μέρει αναστρέψιμη μετά την εκρίζωση του βακτηρίου, υποστηρίζοντας περαιτέρω το ρόλο του *Hp* και των φλεγμονωδών μεσολαβητών στην επιγενετική ρύθμιση.⁶⁷⁻⁶⁹

2. Βιογένεση των microRNA (miRNA ή miR)

2.1 Εισαγωγή

Διάφοροι τύποι μικρών RNA (small RNA) έχουν εξελιχθεί στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς για την καταστολή ανεπιθύμητων γενετικών υλικών και μεταγράφων. Τα μικρά RNA καθορίζονται από το μήκος τους (20-30 νουκλεοτιδίων) και τη σχέση τους με τις πρωτεΐνες της οικογένειας AGO και ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: miRNA, siRNA και piRNA. Τα miRNA αποτελούν κυρίαρχη κατηγορία μικρών RNA στους περισσότερους σωματικούς ιστούς. Είναι μικρά μη-κωδικά RNA που λειτουργούν ως μόρια-οδηγοί κατά την RNA αποσιώπηση. Στοχεύοντας τα περισσότερα κωδικά mRNA, τα miRNA εμπλέκονται σε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές και παθολογικές διεργασίες. Η βιογένεσή τους βρίσκεται υπό αυστηρό χρονικό και ιστο-ειδικό έλεγχο και η δυσλειτουργία τους συνδέεται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως η φλεγμονή, ο καρκίνος και οι νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Αυτά συχνά απορρυθμίζονται σε καρκινικά κύτταρα και αποκαλύπτουν τις λειτουργίες τους είτε ως ογκογόνα (oncomirs) είτε ως ογκοκατασταλτικά microRNA. Έχουν μήκος περίπου 22 νουκλεοτιδίων και από δύο RNάσες-III, τις πρωτεΐνες Drosha και Dicer, που δρουν ειδικά σε δίκλωνο RNA (dsRNA).⁷⁰

Η βιογένεση των miRNA ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα, στο στάδιο της μεταγραφής, της επεξεργασίας τους από την Drosha στον πυρήνα και από τη Dicer στο κυτταρόπλασμα, της RNA τροποποίησής τους με μεθυλίωση, ουριδυλίωση και αδενυλίωση, της φόρτωσής τους στις AGO πρωτεΐνες και της αποικοδόμησης/ανακύκλωσής τους. Διάφορες στρατηγικές υιοθετούνται από το κύτταρο για να ρυθμίζει κάθε στάδιο, όπως η στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών δέσμευσης σε RNA, ενζύμων τροποποίησης RNA και πρωτεϊνών, εξωριβονουκλεασών και ενδοριβονουκλεασών. Ακόμη, υπάρχουν και μη-κανονικά μονοπάτια βιογένεσης, όμως η μεγάλη πλειοψηφία των λειτουργικών miRNAs ακολουθεί το κανονικό μονοπάτι βιογένεσης και μόνο το 1% περίπου των συντηρημένων miRNAs (για παράδειγμα τα miR-320 και miR-451) παράγονται με εναλλακτικούς μηχανισμούς, ανεξάρτητους από τις Drosha ή Dicer. Τέλος, μεταβολές της αλληλουχίας ή/και της δομής των miRNA επηρεάζουν τη βιογένεση, την ωρίμανση και την ανακύκλωσή τους και μεταβάλλουν την εξειδίκευσή τους για τα mRNA-στόχους.⁷⁰

Κατά την RNA αποσιώπηση, το miRNA λειτουργεί ως οδηγός καθώς ζευγαρώνει συμπληρωματικά με τις βάσεις του mRNA-στόχου, ενώ οι AGO πρωτεΐνες λειτουργούν ως τελεστές στρατολογώντας παράγοντες που επάγουν την καταστολή της μετάφρασης, την αποαδενυλίωση του mRNA και την αποικοδόμησή του. Οι θέσεις δέσμευσης του miRNA εντοπίζονται συνήθως στην 3'-UTR των mRNA. Η περιοχή στο 5'-άκρο του miRNA που καλύπτει τις νουκλεοτιδικές θέσεις 2 έως 7 είναι κρίσιμη για την αναγνώριση του στόχου και ονομάζεται 'miRNA seed' (αλληλουχία στόχευσης). Τα ακόλουθα νουκλεοτίδια του miRNA (ιδιαίτερα το 8 και λιγότερο τα νουκλεοτίδια 13-16) συμβάλλουν επίσης στο ζευγάρωμα των βάσεων με το mRNA-στόχο.⁷⁰

Τα miRNA αποτελούν μια από τις πιο άφθονες οικογένειες γονιδίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τους ιούς. Η τελευταία έκδοση της βάσης δεδομένων για τα miRNA (miRBase) έχει καταγράψει 2.675 miRNAs για τον άνθρωπο, αν και η λειτουργική σημασία πολλών από αυτά δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί.^{71,72} Περισσότερα από το 60% των κωδικών γονιδίων στον άνθρωπο περιέχουν μία τουλάχιστον συντηρημένη θέση δέσμευσης miRNA και λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχουν και πολλές μη συντηρημένες, τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μπορεί να βρίσκονται υπό τον έλεγχό τους. Τα miRNA συνδέονται με περίπλοκο τρόπο με μονοπάτια σηματοδότησης, αλλά και οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι παράγοντες επεξεργασίας τους βρίσκονται υπό τον έλεγχο της κυτταρικής σηματοδότησης.⁷⁰

2.2 Ονοματολογία των miRNA

Η ονοματολογία των miRNA γονιδίων είναι κάπως ασυνεπής και οι κανόνες ταξινόμησης δεν έχουν ακόμη ενοποιηθεί. Τα γονίδια που βρέθηκαν στις αρχικές γενετικές μελέτες πήραν το όνομά τους από τους φαινοτύπους τους (για παράδειγμα *lin-4* και *let-7*), ενώ τα περισσότερα miRNAs που βρέθηκαν από κλωνοποίηση ή αλληλούχηση έλαβαν αριθμητικά ονόματα (για παράδειγμα, τα ομόλογα του *lin-4* σε άλλα είδη ονομάζονται *mir-125*). Τα miRNA με ταυτόσημες αλληλουχίες στα νουκλεοτίδια 2-8 του ώριμου miRNA ανήκουν στην ίδια «οικογένεια» και αυτά υποδεικνύονται με αλφαβητικά επιθήματα (για παράδειγμα mir-125a και mir-125b). Εάν το ίδιο ώριμο miRNA παράγεται από πολλούς διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους, προστίθενται αριθμητικά επιθήματα στο τέλος των ονομάτων (για παράδειγμα mir-125b-1 και mir-125b-2). Κάθε γονιδιακός τόπος παράγει δύο ώριμα miRNA, ένα από τον 5' κι ένα από τον 3' κλώνο του προδρόμου (για παράδειγμα, miR-125a-5p και miR-125a-3p). Ο ένας κλώνος (οδηγός κλώνος) είναι συνήθως πολύ πιο διαδεδομένος (96-99% του συνόλου κατά μέσο όρο) και βιολογικώς πιο ενεργός από τον άλλο (συνοδός κλώνος ή miRNA*).⁷⁰

2.3 Πυρηνική επεξεργασία των pri-miRNA

Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται από την RNA Pol-II που δίνει το pri-miRNA δομής φουρκέτας στην οποία εγκλείεται η αλληλουχία του ώριμου miRNA. Η RNA Pol-III μεταγράφει ορισμένα ιικά και μερικά ενδογενή miRNA που προέρχονται από τα tRNAs. Διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, αλλά και επιγενετικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Η πλειονότητα των κανονικών miRNA κωδικοποιούνται από εσώνια μη-κωδικών ή κωδικών μεταγράφων, ενώ ορισμένα miRNA κωδικοποιούνται από περιοχές εξωνίων. Τα miRNA που βρίσκονται σε εσώνια κωδικών γονιδίων μοιράζονται τον υποκινητή του γονιδίου-ξενιστή (host gene). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι τα miRNA γονίδια έχουν συχνά πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής και ότι οι υποκινητές αυτών που εδράζονται σε εσώνια είναι μερικές φορές διακριτοί από τους υποκινητές των γονιδίωνξενιστών. Συχνά, αρκετά miRNA γονίδια βρίσκονται σε στενή εγγύτητα το ένα με το άλλο, συνιστώντας μια πολυσιστρονική μονάδα μεταγραφής, των οποίων η ρύθμιση γίνεται και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Μία από τις πιο συντηρημένες ομάδες είναι το mir-100/let-7/mir-125 σύμπλεγμα που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αμφίπλευρων ζώων. Από αυτά, μόνο το let-7 καταστέλλεται μετα-μεταγραφικά σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα των θηλαστικών.⁷⁰

Μετά την μεταγραφή, το pri-miRNA, του οποίου το μέγεθος είναι μεγαλύτερο από 1 kb, υφίσταται διάφορα στάδια ωρίμανσης. Η πυρηνική RNάση-III πρωτεΐνη Drosha αποκόπτει το primiRNA κι απελευθερώνει το σχήματος φουρκέτας pre-miRNA, μήκους περίπου 65 νουκλεοτιδίων. Μαζί με το συμπαράγοντα DGCR8, η Drosha σχηματίζει ένα σύμπλοκο που ονομάζεται Μικροεπεξεργαστής (Microprocessor). Μετά την επεξεργασία από τη Drosha, το pre-miRNA εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου ολοκληρώνεται η ωρίμανσή του. Η EXP5 εξπορτίνη σχηματίζει ένα σύμπλεγμα μεταφοράς με την πυρηνική GTPάση RAN-GTP κι ένα pre-miRNA. Μετά την μετατόπιση μέσω του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων, το GTP υδρολύεται, με αποτέλεσμα την αποσυγκρότηση του συμπλόκου και την απελευθέρωση του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα.⁷⁰

Η EXP5 εκφράζεται παντού, αλλά έχει αποδειχθεί ότι υπόκειται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση κατά τη διάρκεια εισόδου στον κυτταρικό κύκλο με ένα μηχανισμό στον οποίο μεσολαβεί η PI3K. Σε μια πρόσφατη έκθεση διαπιστώθηκε ότι η εξαγωγή του πυρηνικού pre-miRNA αυξάνεται μετά από βλάβη του DNA, κατά τρόπο εξαρτώμενο από την ATM, η οποία ενεργοποιεί την AKT που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη νουκλεοπορίνη NUP153. Αυτό οδηγεί σε αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ

NUP153 και EXP5. Σε ορισμένους όγκους, το γονίδιο της EXP5 (*XPO5*) μεταλλάσσεται και η προκύπτουσα κολοβή στο C-τελικό άκρο EXP5 αδυνατεί να μεταφέρει το pre-miRNA φορτίο της, μειώνοντας σε γενικές γραμμές τα επίπεδα των ώριμων miRNA.⁷⁰





(a) Σχηματικό μοντέλο μεταγραφής των microRNA από την Pol-II, πυρηνικής επεξεργασίας από το σύμπλοκο του Μικροεπεξεργαστή που περιλαμβάνει τις Drosha και DGCR8 και εξόδου από τον πυρήνα από την EXP5 η οποία είναι σε σύμπλοκο με τη RAN-GTP. (b) Παραδείγματα ρύθμισης της μεταγραφής του miRNA και επεξεργασίας του primiRNA. Οι p53, MYC και MYOD1 αλληλεπιδρούν με τις ομάδες

των miR-34, miR-17 και miR-1, αντίστοιχα. Η MYC καταστέλλει μεταγραφικά το συμπλεγμα των miR-15a και οι ZEB1 και ZEB2 καταστέλλουν τη μεταγραφή του miR-200. Διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των Drosha και DGCR8 ελέγχουν τη δραστικότητα ή/και την εντόπισή τους και η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την τροποποίηση και την επίδραση επί των Drosha και DGCR8 παρουσιάζεται σε κάθε περίπτωση. Η TDP43 που δεσμεύεται σε RNA αλληλεπιδρά επίσης με τη Drosha. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (p68, p72, KSRP, HNRNPA1 και LIN28) ρυθμίζουν επίσης την επεξεργασία του pri-miRNA. Τέλος, οι ADAR1 και ADAR2 μεσολαβούν στη μετατροπή της αδενοσίνης του RNA σε ινοσίνη, η οποία παρεμβαίνει στη Drosha επεξεργασία. (c) Οργάνωση των επικρατειών των Drosha, DGCR8 και ΕΧΡ5. [Τροποποίηση από Ha & Kim 2014]⁷⁰

2.4 Κυτταροπλασματική επεξεργασία των pre-miRNA

Κατά την εξαγωγή στο κυτταρόπλασμα, το pre-miRNA διασπάται από τη Dicer, απελευθερώνοντας ένα μικρό δίκλωνο RNA, το οποίο φορτώνεται στη συνέχεια σε μια AGO πρωτεΐνη για να σχηματίσει το RISC σύμπλοκο τελεστή. Η συγκρότηση του RISC περιλαμβάνει δύο στάδια: τη φόρτωση του dsRNA και την επακόλουθη αποδιάταξή του. Μεταξύ των τεσσάρων AGO του ανθρώπου (AGO1-4), μόνο η AGO2 μπορεί να αποκόψει τέλεια το mRNA-στόχος. Όλες, όμως, είναι ικανές να προκαλέσουν μεταφραστική καταστολή και αποικοδόμηση των mRNA-στόχων μέσω αλληλεπίδρασης με τον μηχανισμό της μετάφρασης και τους παράγοντες αποικοδόμησης mRNA. Μετά την φόρτωση με δίκλωνο miRNA, το pre-RISC (στο οποίο οι AGO συνδέονται με τα dsRNA) απομακρύνει γρήγορα το συνοδό κλώνο για να δημιουργήσει ένα ώριμο RISC.⁷⁰





(a) Σχηματικό μοντέλο επεξεργασίας από τη Dicer και φόρτωσης στην AGO. Η Dicer αλληλεπιδρά με την TRBP που δεσμεύει dsRNA. Μετά τη Dicer επεξεργασία, το dsRNA απελευθερώνεται και ακολούθως φορτώνεται στις ανθρώπινες AGO1-4. Το σύμπλοκο HSC70-HSP90 πρωτεϊνών θερμικού σοκ υδρολύει το ΑΤΡ κατά τη φόρτωση του dsRNA. Ο συνοδός κλώνος απορρίπτεται και το ώριμο miRNA (οδηγός κλώνος) παραμένει σε μία από τις AGO πρωτεΐνες. (b) Οι πρωτεΐνες TRBP και AGO υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες επηρεάζουν την ικανότητά τους να ρυθμίζουν την επεξεργασία από τη Dicer, τον σχηματισμό του RISC συμπλόκου και τη miRNA δραστικότητα. Η πρόσδεση της ουράς του miRNA από τις TUT4 και TUT7, η μεθυλίωσή του από τη BCDIN3D, η επεξεργασία του από την ADAR1 και η αποσταθεροποίησή του από τις MCPIP1 και IRE1α, επίσης αναστέλλουν την επεξεργασία από τη Dicer. Η μείωση της σταθερότητας του miRNA μπορεί να μειώσει τη δραστικότητά του. (c) Οργάνωση των επικρατειών των Dicer, TRBP και AGO2. [Τροποποίηση από Ha & Kim 2014]69

Ο οδηγός κλώνος προσδιορίζεται κατά το στάδιο φόρτωσης της AGO, κυρίως με βάση τη σχετική θερμοδυναμική σταθερότητα των δύο άκρων του μικρού dsRNA. Ο κλώνος με ένα σχετικά ασταθές 5'-άκρο τυπικά επιλέγεται ως ο οδηγός κλώνος. Επιπλέον, για την επιλογή κλώνου σημαντική είναι η πρώτη νουκλεοτιδική αλληλουχία, καθώς οι AGO πρωτεΐνες επιλέγουν οδηγό κλώνο με U στην νουκλεοτιδική θέση 1. Ο συνοδός κλώνος που απελευθερώνεται αποικοδομείται μπορεί επίσης να επιλεγεί με διαφορετική συχνότητα. Ο λιγότερο άφθονος συνοδός κλώνος

(miRNA*) είναι επίσης ενεργός στην αποσιώπηση, αν και συνήθως λιγότερο ισχυρός από τον πιο άφθονο οδηγό κλώνο.⁷⁰

Οι TRBP και PACT συμπαράγοντες της Dicer έχουν περιγραφεί ως αρνητικοί και θετικοί ρυθμιστές της εξαρτώμενης από dsRNA κινάσης PKR, αντίστοιχα. Η σχέση μεταξύ του μονοπατιού της miRNA βιογένεσης και της PKR σηματοδότησης είναι άγνωστη. Η TRBP μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την MAPK/ERK, και αυτό οδηγεί στην αυξο-ρύθμιση των miRNA που προάγουν την ανάπτυξη και στη μειο-ρύθμιση των let-7 miRNA. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η TARBP2 μεταλλάσσεται σε ανθρώπινους καρκίνους. Θεωρείται ότι η μείωση της TRBP πρωτεΐνης οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της Dicer και σε μείωση των επιπέδων των miRNA. Το ανθρώπινο *DICER1* mRNA περιέχει θέσεις δέσμευσης για το let-7, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα ένα βρόγχο αρνητικής ανατροφοδότησης μεταξύ της Dicer και του let-7. Η ρύθμιση αυτή θεωρείται ότι συμβάλλει στην ομοιοστατική ρύθμιση της δραστικότητας της Dicer. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA συμμετέχουν επίσης στον έλεγχο της επεξεργασίας του pre-miRNA είτε θετικά είτε αρνητικά. Οι πρωτεΐνες LIN28 (LIN28A και LIN28B) δεσμεύονται στο pre-let-7, παρεμβαίνοντας στην επεξεργασία από τη Dicer και περαιτέρω μπλοκάροντας την ολιγο-ουριδυλίωση του pre-let-7 κι επομένως την ωρίμανσή του, ενώ το let-7 μειο-ρυθμίζει τις LIN28 δεσμεύοντας την 3'-UTR τους. Επιπλέον, το let-7 στοχεύει τη MYC, η οποία ενεργοποιεί τη μεταγραφή των LIN28 στα θηλαστικά.⁷⁰

3. Τα microRNA στην *Η. pylori* λοίμωξη

3.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό πως η ανοσοαπόκριση του ξενιστή δεν είναι αποτελεσματική στην εξάλειψη του *Hp*. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στην απορρύθμιση που προκαλείται από τα βακτήρια του προτύπου έκφρασης των miRNAs που στοχεύουν κυτταροκίνες και άλλους μεσολαβητές της ανοσοαπόκρισης. Τα miRNAs πιθανώς συμβάλλουν στην επίδραση του κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου, καθώς κάθε miRNA μπορεί δυνητικά να ελέγξει εκατοντάδες έως χιλιάδες γονίδια-στόχους και η απορρύθμισή τους σχετίζεται με ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διαταραχές, καθώς και διάφορες κακοήθειες. Η έκφραση των μεσολαβητών της ανοσοαπόκρισης μπορεί να ρυθμιστεί από τα miRNA, αλλά και οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορούν να αλλάξουν την έκφραση αυτών. Ως εκ τούτου, τα miRNAs ρυθμίζουν την *H*p λοίμωξη και επηρεάζονται επίσης από το βακτήριο.⁵⁰

Το *H. pylori* χειραγωγεί τους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων-ξενιστών με ειδική ρύθμιση της παραγωγής των miRNA προκειμένου να εδραιώσει την επιβίωσή του. Οι κύριες διεργασίες που επηρεάζονται από την απορρύθμιση διαφόρων miRNAs είναι η ανοσοαπόκριση, η αυτοφαγία, ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση. Επιπλέον, το *Hp* μπορεί να επηρεάσει την έκφραση διαφόρων miRNA που συμμετέχουν στην επιγενετική τροποποίηση ή/και γονιδίων που τροποποιούν επιγενετικά τα γονίδια των miRNA. Από τα πρώιμα στάδια της *Hp* γαστρίτιδας, το φλεγμονώδες περιβάλλον προκαλεί μεταλλάξεις, επιγενετικές τροποποιήσεις, αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και των miRNA, γενωμική αστάθεια, αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση και ανισορροπία πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων, προωθώντας την εξέλιξη από γαστρίτιδα σε προ-νεοπλασματικές και νεοπλασματικές αλλοιώσεις. Όσον αφορά ειδικότερα το στομάχι, υπάρχουν διάφορες μελέτες που αναφέρουν διαφορετικά miRNA στο φυσιολογικό

βλεννογόνο, στις προκαρκινικές αλλοιώσεις και στο γαστρικό καρκίνο που επάγονται από το *Hp*. Ενώ, διάφορα SNPs των miRNA και των γονιδίων-στόχων αυτών που σχετίζονται με τη φλεγμονή μπορεί να συμβάλλουν στη γαστρική καρκινογένεση, καθώς ένα μικρό μόνο ποσοστό μολυσμένων ασθενών αναπτύσσει τελικά γαστρικό καρκίνο.⁵⁰

3.2 Ρύθμιση των microRNA στην *Η. pylori* λοίμωξη

Η μεθυλίωση του DNA και η τροποποίηση των ιστονών, επιγενετικές αλλαγές που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση κάποιων miRNAs. Η *Hp* λοίμωξη βρέθηκε ότι οδηγεί σε ουμπικουϊτινίωση και μείωση των επιπέδων της Drosha σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα και ότι η χορήγηση του MG132 αναστολέα του πρωτεασώματος συσχετίζεται με τη διατήρηση των επιπέδων της Drosha παρά τη λοίμωξη, υποδηλώνοντας ότι το βακτήριο ενισχύει το μονοπάτι ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος και μπορεί να οδηγήσει σε μειο-ρύθμιση των miRNAs επηρεάζοντας μετα-μεταγραφικά την έκφραση της Drosha.⁵⁰

Η GKN1 πιστεύεται ότι λειτουργεί ως υπομεθυλιωτικός παράγοντας και ασκεί τα αντιπολλαπλασιαστικά της αποτελέσματα μέσω της μειο-ρύθμισης των DNMT1 και EZH2, μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και την ΕΜΤ μετατροπή (μέσω αλληλεπίδρασης με τη Snail και την καταστολή της έκφρασης της Ε-καδερίνης). Πράγματι, η αδρανοποίηση των DNMT1 και EZH2 σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στις G₀/G1 και G2/M φάσεις, υποδηλώνοντας ότι η GKN1 δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας μέσω της ρύθμισης των επιγενετικών ρυθμιστικών συστατικών και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ΕΜΤ. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση των DNMT1 και c-myc συσχετίζεται επίσης θετικά με την CagA και την κατάσταση μεθυλίωσης, υποστηρίζοντας έντονα την άποψη ότι η GKN1 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση. Η GKN1 βρέθηκε ότι είναι μειωμένη στον Ηρ μολυσμένο βλεννογόνο και η μείωση αυτή είναι προοδευτική από τη χρόνια γαστρίτιδα στην ατροφία και την εντερική μεταπλασία. Σε δείγματα μη-νεοπλασματικού βλεννογόνου ασθενών με σποραδικό γαστρικό καρκίνο, τα επίπεδα GKN1 ήταν σε θέση να προβλέψουν την ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου και τον κίνδυνο εντερικής μεταπλασίας, ενεπλέκοντας την GKN1 ως σημαντικό παράγοντα στη φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου και δείκτη της εξέλιξης της γαστρικής καρκινογένεσης.⁵⁰

Το *Hp* ενεργοποιεί πολλαπλούς ογκογόνους μηχανισμούς, όπως το PI3K/AKT/GSK3β μονοπάτι που ρυθμίζει πολλές λειτουργίες, την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την κινητικότητα, και η ανώμαλη ενεργοποίησή του συνδέεται με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του γαστρικού.^{73,74} Η παρουσία αυτών των βακτηρίων επηρεάζει επίσης το STAT3 μονοπάτι που ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, όπου η υπερέκφραση του STAT3 σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και κακή πρόγνωση του γαστρικού καρκίνου.⁷⁵ Η απορρύθμιση των miRNA μπορεί να προάγει τον κυτταρικό κύκλο αυξάνοντας την έκφραση των κυκλινών ή/και μειώνοντας την έκφραση των CDK αναστολέων. Η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι σημάδια κακοηθειών. Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου απαιτεί τη συντονισμένη έκφραση των κυκλινών, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη διαδοχική ενεργοποίηση των CDKs. Το *Hp* μπορεί ενδεχομένως να ασκήσει καρκινογόνο δράση, μερικώς, με τη διαμόρφωση της έκφρασης των κυκλινών, των CDKs και των CDK αναστολέων (p15, p16, p18, p19, p21, p27, p28, p57) και την απορρύθμιση των miRNAs του ξενιστή και άρα του κυτταρικού κύκλου και να αυξήσει την τάση για γαστρικό μετασχηματισμό. Η FoxM1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου καθώς ελαττώνει την έκφραση της ογκοκατασταλτικής p27^{Kip1} (αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου) και η έκφρασή της σταδιακά αυξάνεται από τη γαστρίτιδα στο γαστρικό καρκίνο. Έχει δειχθεί ότι η CagA αυξο-ρυθμίζει την έκφραση της FoxM1 και παρεμποδίζει τη μεταγραφή της p27^{Kip1} μέσω του PI3K/Akt μονοπατιού.⁵⁰

Τα microRNAs φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης αλλάζοντας την έκφραση των προ- και αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Ο κυτταρικός μετασχηματισμός χαρακτηρίζεται επίσης από αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης, η οποία μπορεί να εξαρτάται από το ενδογενές ή το εξωγενές μονοπάτι. Το εξωγενές ξεκινά μέσω της ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών υποδοχέων θανάτου που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια από προσδέτες όπως ο TNF. Η σύνδεση του προσδέτη επάγει τη συσσώρευση των υποδοχέων και τη στρατολόγηση του FADD, που οδηγεί στην επαγωγή των κασπασών και τελικά στον κυτταρικό βάνατο. Το ενδογενές αποπτωτικών (Bax, Bak, Bim, BNIP3L και Bid) και των αντι-αποπτωτικών (Bcl-2, Bcl-xL και Mcl-1) πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.1 Παθογένεια της Η. pylori λοίμωξης και η ανοσοαπόκριση του ξενιστή.⁶¹

(A) Η βακτηριακή ουρεάση εξουδετερώνει το γαστρικό pH, επιτρέποντας την εγκατάσταση του Hp στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και την είσοδό τους στη στιβάδα της βλέννας. Η προσκόλληση των βακτηρίων στο γαστρικό επιθήλιο προκαλείται από τις βακτηριακές προσκολλητίνες BabA και SabA, επιτρέποντας τη διείσδυση των CagA και VacA στα κύτταρα-ξενιστές, γεγονός που προκαλεί ισχυρή ανοσοαπόκριση στο γαστρικό βλεννογόνο. Ο LPS του Hp αναγνωρίζεται από τους TLR4 και TLR2, σε συνεργασία με το μόριο προσαρμογέα MyD88 που σχετίζεται με τις IRAK1 και IRAK4 και οδηγεί στη διέγερση του NF-κB, ενεργοποιώντας τα φλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης. (B) Η ανοσοαπόκριση ενεργοποιείται επίσης, με την πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της λοίμωξης, προκαλώντας την παραγωγή διαφόρων προ- και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και ιντερλευκινών, και η επακόλουθη ενεργοποίηση ογκογόνων μοριακών μονοπατιών σηματοδότησης μεσολαβούν στην καρκινογένεση. (D) Η έκφραση κάποιων miRNAs μεταβάλλεται από την Hp λοίμωξη και η ανοσοαπόκριση του ξενιστή ρυθμίζεται αναλόγως. [Τροποποίηση από Τarga-Cadamuro *et al.* 2014]⁶¹

Ο TGF-β εμπλέκεται στην ανοσία του βλεννογόνου και στον έλεγχο της φυσιολογικής ανακύκλωσης των επιθηλιακών κυττάρων και οι καταρροϊκοί τελεστές της εξαρτώμενης από τον TFGβ διακοπής του κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης είναι ο CDK αναστολέας p21^{CIP1/WAF1} και ο προαποπτωτικός παράγοντας Bim, αντίστοιχα. Ο TGF-β προκαλεί μια σημαντική μειο-ρύθμιση της E2F1 πρωτεΐνης και του *Mcm7* mRNA (που περιέχει τα εσωνικά miR-106b, miR-93 και miR-25) καθώς τα κύτταρα φυσιολογικά υποβάλλονται στην G1/S διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, οι γαστρικοί όγκοι διάχυτου τύπου χαρακτηρίζονται από E2F1 αυξο-ρύθμιση και αντίσταση στον TGF-β, ενώ η παρατεταμένη έκθεση στον TGF-β οδηγεί σε απόπτωση. Το CD44 είναι ένα βασικό μόριο προσκόλλησης και υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος που μπορεί να συντονίσει το φυσιολογικό και μεταπλαστικό πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων του γαστρικών βλαστικών κυττάρων. Η CD44ν παραλλαγή του CD44 αλληλεπιδρά με την xCT και συμβάλλει στην άμυνα των καρκινικών κυττάρων έναντι των ROS, επιτρέποντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους.⁵⁰

Το *Hp* μπορεί να απορρυθμίσει την έκφραση των miRNA για να διαφύγει της άμυνα του ξενιστή, ενώ τα miRNA μπορούν να ρυθμίσουν την TLR σηματοδότηση και να εναρμονίσουν την έμφυτη ανοσοαπόκριση, αποτρέποντας την υπερβολική φλεγμονώδη απόκριση. Τα miR-146a και miR-155 τα οποία βρέθηκαν να αυξο-ρυθμίζονται από το *Hp* (ανεξάρτητα από το *cagPAI*) ρυθμίζουν την οξεία φλεγμονώδη απόκριση μετά την αναγνώριση του παθογόνου από τους TLR, συμβάλλοντας σε αρνητική ρύθμιση της προ-φλεγμονώδους ανοσοαπόκρισης. Η ενεργοποίηση της TLR σηματοδότησης και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TNF-α, IL-1β και IL-6, έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυξο-ρυθμίζουν τα miR-146 και miR-155 κατά τη διάρκεια της λοίμωξης.⁵⁰

Τα miR-146a και miR-155 δεν εκφράζονται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα κατά τη λοίμωξη, ενώ το miR-146 βρέθηκε ότι αυξο-ρυθμίζεται ταχέως στα μυελοειδή κύτταρα (μονοκύτταρα/ μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα) με τρόπο ανεξάρτητο από την CagA.⁷⁶ Το miR-155 αυξο-ρυθμίζεται στα μυελοειδή κύτταρα μετά από TLR και NLR (NOD2) διέγερση μέσω ενός εξαρτώμενου από τους NF-κB και AP-1 μηχανισμού και στα ενεργοποιημένα B και T κύτταρα μέσω ενός ανεξάρτητου των TLR συστήματος που προκύπτει εν μέρει από την ενεργοποίηση PAMP υποδοχέων από το T4SS, ανεξάρτητων από το MyD88/Trif.⁵⁰ H έκφραση του miR-155 στα T-κύτταρα και τα μακροφάγα εξαρτάται, επίσης, από τη FOXP3. Το miR-155 κωδικοποιείται από τον *BIC* γονιδιακό τόπο, ο οποίος αντιπροσωπεύει μια κοινή περιοχή ιικής ενσωμάτωσης στα κοτόπουλα, συμμετέχει στην ανάπτυξη κακοηθειών B-κυττάρων κι έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα στο B-κυτταρικό λέμφωμα του ανθρώπου.⁷⁶

Η οικογένεια του miR-200, η οποία περιλαμβάνει τα miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 και miR-429, αναστέλλει την ΕΜΤ μετατροπή και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Όλα αυτά τα μέλη εμπλέκονται σε έναν βρόγχο αρνητικής ρύθμισης στον οποίο μπλοκάρουν τους μεταγραφικούς καταστολείς της Ε-καδερίνης ZEB1 και ZEB2, μειο-ρυθμίζοντας τη μεταγραφή της miR-200 οικογένειας. Η έκφραση αυτών των miRNAs χάνεται σε διηθητικά καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο.⁷⁶

Έχει δειχθεί ότι η CagA μειώνει την έκφραση του miR-101, το οποίο με τη σειρά του εξασθενεί την έκφραση του let-7 με μεθυλίωση των ιστονών και του DNA.⁷⁷ Ενώ, η ωρίμανση του let-7 αναστέλλεται από την ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της Lin-28B.^{78,79} Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της δράσης της CagA, καταστέλλεται η έκφραση των miR-320, miR-370⁸⁰, miR-372, miR-373⁶¹, miR-200b και miR-200c⁸¹ μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB, καθώς και των miR-320a και miR-4496⁸². Από την CagA εξαρτάται, επίσης, η επαγωγή των miR-21⁸³, miR-27a⁷⁶, miR-223⁸⁴, miR-663⁸³, miR-1289, του miR-584 μέσω του NF-κB και του miR-1290 μέσω του Erk1/2.⁵⁰

Η έκφραση του miR-106a αυξάνεται σταδιακά κατά τη μετάβαση από την άτυπη υπερπλασία σε προηγμένο καρκίνωμα κι έχει θετικά σήματα σε πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις αλλά αρνητικά

σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου, υποδεικνύοντας ότι οι μεταβολές του miR-106a ενδέχεται να καταστούν βιολογικοί δείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου. Το miR-223 είναι επίσης υπερεκφρασμένο στο γαστρικό καρκίνο κι έχει προταθεί ως ένας χρήσιμος βιοδείκτης ορού για την ανίχνευσή του.⁵⁰ Σε μια πρόσφατη μελέτη, θεραπεία με παράγοντες απομεθυλίωσης μείωσε τη μεθυλίωση του miR-10b και αποκατέστησε την έκφρασή του, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμισή του μπορεί να αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση στο γαστρικό καρκίνο.⁸⁵ Επιπλέον, η θεραπεία με αναστολέα της COX-2 (celecoxib) ενεργοποιεί σημαντικά την έκφραση του miR-29c που καταστέλλει το αντι-αποπτωτικό Mcl-1. Το μονοπάτι αυτό μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς των χημειο-προστατευτικών αποτελεσμάτων των εκλεκτικών αναστολέων της COX-2 για τη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, μέσω της αποκατάστασης του miR-29c.⁵⁰ Τέλος, η ισοπροτερενόλη φάνηκε ότι αυξάνει την έκφραση του CD44 κι ανέστειλε το miR-373 ενεργοποιώντας το STAT3 μονοπάτι μέσω β-2 αδρενεργικών υποδοχέων.⁶¹

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια miRNA των οποίων η έκφραση φαίνεται να απορρυθμίζεται κατά την *Hp* λοίμωξη ή/και στο γαστρικό καρκίνο, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη-μολυσμένα και μη-καρκινικά δείγματα. (Το miR-17-92 σύμπλεγμα περιλαμβάνει τα miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a και miR-92-1, το miR-106b-93-25 σύμπλεγμα τα miR-106b, miR-93 και miR-25 και η οικογένεια του miR-200 περιλαμβάνει τα miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 και miR-429.)

Πίνακας 3.1 Ρύθμιση της έκφρασης των microRNAs στην *Η. pylori* λοίμωξη (ΗΡ) και στο γαστρικό καρκίνο (GC) σε σχέση με δείγματα φυσιολογικού μη-μολυσμένου και μη-καρκινικού γαστρικού βλεννογόνο, αντίστοιχα, καθώς και τα επακόλουθα αποτελέσματα της ρύθμισης αυτής. [Τροποποίηση από Libânio *et al.* 2015]⁵⁰

microRNA	HP	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ρύθμιση του miRNA)				
			c-myc Ras	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και σχηματισμός				
lot-7	.1.	.1.		αποικιών	50,77			
	V	¥	HMGA2, DNMT3B, EZH2, Cthrc1	Διήθηση και μετάσταση, ενεργοποίηση Ras μονοπατιού				
let-7b	\downarrow	\checkmark	TLR4	Αύξηση MyD88, ενεργοποίηση του NF-κΒ, αύξηση των COX-2 και κυκλίνη-D1, 个 IL-1β, IL-8				
lot 7f	\uparrow	\uparrow	MYH9	Αναστολή διήθησης και μετάστασης (στα EVs)	49,77,			
let-71	\downarrow			Διήθηση	85–88			
miR-1	\uparrow	\uparrow	FOXP1	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	90,91			
miR-10b	\rightarrow		MAPs	Ογκογένεση	50			
miR-15b		\downarrow	Bcl-2	Αναστολή απόπτωσης	50			
miR-16		\downarrow	Bcl-2	Αναστολή απόπτωσης	50			
				Επάγεται από την αυξημένη έκφραση του c-Myc				
miR-17/92		\uparrow		Λεμφοπολλαπλασιαστική ασθένεια και αυτοανοσία, Β-	50			
				κυτταρικό MALT λέμφωμα				
				Επάγεται από τις ΑΡ-1 και STAT3 μέσω των ΝF-κΒ και				
				ΙL-6, αντίστοιχα	40.00			
miR-21	\wedge	$\mathbf{\Lambda}$	RECK	Αναστολή απόπτωσης, διέγερση ΜΜΡ, αγγειογένεση,	49,60,			
11111 21	I	I					πολλαπλασιασμός και διήθηση	75
					PTEN, TMP1, ABP	PI3K/Akt ενεργοποίηση, κυτταρική επιβίωση		
			TGFBR1, TGFBR2	Ρύθμιση της φλεγμονής				
miR_2/1_3	.1.	\wedge	PRDX6	Αναστολή απόπτωσης, κυτταρική ανάπτυξη, διήθηση,	92			
111111-24-3	\mathbf{v}	μετάσταση		μετάσταση				
miR-25		\uparrow	Bim, p27, p57	Προώθηση κυτταρικού κύκλου, αναστολή απόπτωσης	86			
miR-26h	.1.	.1.	κρια 2	Ενεργοποίηση KPNA2/c-jun μονοπατιού, διήθηση,	90,93			
11111 200	¥	v		λεμφική μετάσταση				
			FoxO1, PHB	Αύξηση οξειδωτικού στρες				
miR-27a	\uparrow	\uparrow	ZBTB10	Πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση	50,76			
	Myt-1		Myt-1	Προώθηση κυτταρικού κύκλου (G2/M)				

Πίνακας 3.1 συνέχεια

microRNA	HP	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ρύθμιση του miRNA)		
miR-27b	\downarrow		FZD7	Ενεργοποίηση WNT μονοπατιού	94	
			p42.3, Mlc-1	Προώθηση κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιασμός		
			HAS3, ROBO1,			
miR 20a			CCND2, MMP2,	Πολλαπλασιασμός, μετανάστευση, διήθηση καρκινικών	50,95-	
111111-2.50		\mathbf{v}	AKT2, GSK3B,	κυττάρων, μετάσταση	100	
			ITGB1, CDKs			
			VEGF	Αγγειογένεση, μετάσταση		
miR-29b-1	\uparrow		PHLPP1	Ενεργοποίηση των ΜΜΡ-2 και ΜΜΡ-9	101	
miR-29c		\downarrow	Mcl-1, DMNT3A	Αναστολή απόπτωσης	50	
miR-30b	\uparrow		BECN1, ATG12	Μείωση αυτοφαγίας, αύξηση βακτηριακής επιβίωσης και αναπαραγωγής	102	
miR-30d	\uparrow		ATG2B, ATG5, ATG12, BECN1, BNIP3I	Μείωση αυτοφαγίας, αύξηση ενδοκυτταρικής επιβίωσης του <i>Ηρ</i>		
			KLF4	Πολλαπλασιασμός. διήθηση καρκινικών κυττάρων		
miR-32		\wedge	SMAD7. GATA6.		104,105	
_			MYH9, SOX4	Αναστολή πολλαπλασιασμού και διήθησης		
miR-34	\downarrow	\downarrow	Bcl-2	Αναστολή απόπτωσης	50	
miR-34a		\uparrow	FOXP1	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, λεμφική διήθηση	91	
10.400	•		00114 70 4	Δυσλειτουργία συνδέσμων, αναστολή mTOR	106	
miR-100	T		CDH1, 20-1	μονοπατιού		
10.404			SOC2	Μείωσητου let-7	50	
miR-101	\checkmark	\checkmark	Mcl-1	Αναστολή απόπτωσης		
				↑ΙL-1β, IL-6, IL-8 και διήθησης ουδετεροφίλων και	50,61	
MIK-103	\checkmark		INFA	μονοπύρηνων	,	
miR-103a	\downarrow		IL6, IL12A, TNFA			
miR-106a		\uparrow	RB1	ΜεταγραφήΕ2F, μετάσταση		
miD 10Ch				Πολλαπλασιασμός (TGF-β: επαγωγή του κυτταρικού	50	
MIK-1060	\checkmark		JAKZ/STAT3	κύκλου), ΜΑΡΚ μονοπάτι		
miD 10Ch				Μειο-ρύθμιση μεσολαβούμενη από τον TGF-β	49,60,	
111K-1000-		\uparrow	p21 ^{CIP1/WAF1} , E2F1	Μειωμένη απόκριση στον TGF-β	75	
95-25			Bim	Προώθηση κυτταρικού κύκλου, αναστολή απόπτωσης		
			SMOX	Βλάβη του DNA, φλεβική και λεμφική διήθηση, λεμφική		
miR-124	\downarrow	\checkmark	510107	μετάσταση, κακή διαφοροποίηση	50	
			CDK6	Προώθηση κυτταρικού κύκλου		
miR_125h	.1.	$\mathbf{\Lambda}$		Μειώνεται παράλληλα με την αύξηση του miR-155 (HP)	50,76	
11111-1250	\mathbf{v}	1		Παραγωγή TNF-α μετά από TLR διέγερση	10-	
miR-128	\downarrow	\downarrow		Ενεργοποίηση μονοπατιού ΜΜΡ-3, -7/Ε-καδερίνης	107	
miR-130	\uparrow		Bim	Προώθηση κυτταρικού κύκλου, αναστολή απόπτωσης	50	
				Πολλαπλασιασμός (CDK2 ενεργοποίηση) και διήθηση,	50	
miR-130b		\uparrow	RUNX3, Bim	εξασθένηση TGF-β σηματοδότησης, αναστολή	50	
				απόπτωσης		
miR-132		\uparrow	SIRT	个ABCG2 μεταφορέα, χημειο-αντίσταση, χαμηλή επιβίωση	108	
miR-133a	\leftarrow		SP1, IGF1, ERBB2, MCL1, BCL-XL	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	109	
	•		TREAMING	Αναστολή απόπτωσης, πολλαπλασιασμός		
miR-135b	T		TP53INP1	λεμφοκυττάρων (MALT-λέμφωμα)	110	
		\uparrow	KLF4, APC			
miR-139		\uparrow	CXCR4	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	91	
miR-141	\downarrow		FGFR2	Πολλαπλασιασμός	50,78	
miR-142-5p	\uparrow	\uparrow	TP53INP1	Αναστολή απόπτωσης (MALT-λέμφωμα)	78	
miR-142a	\uparrow		TP53INP1	Αναστολή απόπτωσης, πολλαπλασιασμός	110	
				λεμφυκυτιαμών (IVIALT) Μείωση κυπταρικής ανάπτυξης, διάθησης και		
miR-143-3p	\uparrow	\downarrow	AKT2	μετανάστευσης		

Πίνακας 3.1 σ	υνέχεια	χ				
microRNA	HP	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ρύθμιση του miRNA)	Αν.	
			IRAK1 TRAF6	Αντιφλεγμονώδης ρύθμιση, μειωμένη ενεργοποίηση		
				του NF-Kβ και μείωση των προ-φλεγμονωδών		
				κυτταροκινών IL-1β, IL-8, TNF-α, GRO-α		
	\uparrow			Μείωση προσταγλανδίνης Ε2 και άρα μείωση του		
			F1032 (COX-2)	φλεγμονώδους διηθήματος		
			SMAD4	Αναστολή απόπτωσης		
			CARD10, COPS8	Μειωμένη ενεργοποίηση του ΝF-κΒ,	49,60,	
miR-146a			L1CAM	Καταστολή διήθησης και μετάστασης	75,95	
				Φλεβική και λεμφική διήθηση, λεμφική μετάσταση,		
			EGFR, IRAKI	κακή διαφοροποίηση, χαμηλή επιβίωση		
			COX-2	Επαγωγή απόπτωσης		
		\mathbf{V}		Μείωση DDR (ομόλογου ανασυνδυασμού), προαγωγή		
			FANCM	κυτταρικού κύκλου		
				↑ΙL-10, IL-1β και IL-23, αναστολή κυτταρικού		
				πολλαπλασιασμού, προαγωγή απόπτωσης		
miR-148a	\downarrow	\downarrow		Ενεργοποίηση μονοπατιού MMP-3,-7/Ε-καδερίνης	107	
	\uparrow	\uparrow	TP53INP1	MALT	78,93,	
miR-150	\uparrow		POLD3	Μείωση DDR (MMR)	96	
				Ανοσορούθμιση της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας.	94	
miR-152	\downarrow		B7-H1 (PD-L1)	αναστολή ενεονοποίησης των Τ-κυττάρων	94	
				ΜειωμένηενεργοποίησητωνΤΒΑΕ6 και ΝΕ-κΒ		
				(μέσωτουΤΙ Β/ΙΙ -1), μειωμένη έκκοισητωνποο-		
			TAB2, IKK, NIK	φλενμονωδώνκυτταροκινώνΤΝΕ-α ΙΙ-8 ΙΙ-6 ΙΙ-18 ΙΙ-12		
				και GRO-α(CXCI 1)		
			SMAD2 ΕΔΟΟ	Μείωση κασπασών κι εποιιένως αναστολή απόπτωσης		
				Αναστολή απόπτωσης στο ΜΑΙΤ-λέμφωμα	-	
	\uparrow		Tenan14 Inin1		49,6U,	
miR-155			Dmain1 DKla	Ανοσοαπόκριση και απόπτωση	75,97,	
				Maiura DDP (MMP)	98	
			WISHZ, KIP		-	
				και αναπτυξή των freg, καταστολή miok μονοπατίου,		
				παραγωγή IFN-γ, αναπτυξή Τη κυτταρών, αυτοφαγια	-	
		\downarrow		Φλερική και λεμφική οιήθηση, λεμφική μεταστάση,		
	•	Τimp3, CALM2		κυτταρικός πολλαπλασίασμος, ΕΝΠ, διηθηση και		
	T	T	CDV2		50,116-	
MIK-1810			CDX2	Φλεγμονωσης καρκινογενεση	121	
		\downarrow	Bcl-2, HK2, CREB1	Αναστολή αποπτωσής, αυξήση γλυκολυσής,		
		1		πολλαπλασιασμος	50,78	
MIK-181C	\downarrow	\checkmark	BCI-2, IL12A, INFA	Αναστολή αποπτωσής	,	
10.405				Μειωνεται ως αποτελεσμα της μειωσης της GKN1	50	
miR-185	\downarrow	\downarrow	DNM11,EZH2	Μεθυλιωση του DNA, πολλαπλασιασμος, ΕΜΤ, λεμφικη		
				μετάσταση, κακή πρόγνωση		
			RAB11/FIP2	Επίδραση στην κυτταρική πολικότητα και τους	122-	
miR-192		\uparrow		στενοσυνδέσμους	125	
			ZEB1/2,	Ενεργοποίηση TGF-β. πολλαπλασιασμός, διήθηση, EMT	125	
			SMG1, BMI1		126	
miR-193a		\downarrow	PLAU, KRAS		120	
miR-196a	\wedge	$\mathbf{\Lambda}$	SMAD4	(CD44) Διαφοροποίηση, διήθηση, μετάσταση, ρύθμιση	127	
				έκκρισης IL-6		
			7FB1/2	Επιθηλιακή διαφοροποίηση, καταστολή της ΕΜΤ,	40.60	
				αναστολή διήθησης και μετάστασης		
miR-200		1	CCND1	Πολλαπλασιασμός	49,60,	
οικογένεια	↓	\vee	Bcl-2, XIAP	Αναστολή απόπτωσης	75	
			11.6	个IL-1β, IL-8, TNF-α και διήθησης ουδετεροφίλων και		
			11-0	μονοπύρηνων		

microRNA	HP	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ρύθμιση του miRNA)	Av.	
	1			Ανοσορρύθμιση της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας,		
miR 200h	\mathbf{v}		B7-HI (PD-LI)	αναστολή ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων	60,83,	
11111-2000		\downarrow	ZFHX1B		101	
		\uparrow	ZEB1	EMT		
				Μειώνεται παράλληλα με την αύξηση των miR-142a και		
				miR-150	49,77, 102	
miR-203	\downarrow	\downarrow	CASK	Σχηματισμός αποικιών, κυτταρική ανάπτυξη και		
			en on	διήθηση		
			ABL1	Υπερμεθυλίωση, MALT	_	
			SIRT1	ΕΜΤ, διήθηση, μονοπάτια ασβεστίου και	40.77	
miR-204	J.			νευροτροφίνης	49,77,	
	v		ErbB3	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετάσταση	105,104	
			SOX4	EMT		
miR-205		\downarrow	ICT1, ZEB1	Μετάσταση, λεμφική μετάσταση, ΕΜΤ	132,133	
			STMN1	Ανώμαλος πολλαπλασιασμός επιθηλιακών κυττάρων	_	
				Αυξημένο φλεγμονώδες διήθημα, αύξηση βακτηριακής		
miR-210	1	\downarrow	DIMT1	πυκνότητας, ατροφία, διήθηση ουδετεροφίλων και	50,91	
	•	•		μονοκυττάρων	_	
				↓DDR, κυτταρική επιβίωση, διαφοροποίηση,		
				αγγειογένεση	130	
miR-211	\downarrow		ErbB3	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετάσταση		
miR-212-3p	\downarrow		COX2			
			RAB11/FIP2	Επίδραση στην κυτταρική πολικότητα και τους	122 123	
miR-215		个		στενοσυνδέσμους	- 122,123	
			SMG1	Πολλαπλασιασμός, διήθηση, ΕΜΤ	-	
			ECOP	Ενεργοποίηση του NF-κB, αύξηση της COX-2, αναστολή	50	
miR-218 ↓	\downarrow	\downarrow		απόπτωσης	_	
		•	SLIT/ROBO1 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διήθηση και μετάστασ		76	
miR-221		个	p27 , p57	Προωθηση κυτταρικου κυκλου (G1/S μεταβαση)		
	•	•	RECK	Σχηματισμός βακτηριακών αποικιών, κυτταρικός	61,76	
miR-222	T	T		πολλαπλασιασμος		
			p27 *, p57 *	Προωθηση κυτταρικου κυκλου (G1/S μεταβαση)	-	
			EPB41L3	Σχηματισμος αποικίων, πολλαπλασιασμος,		
			-	μεταναστευση και διηθηση ουδετεροφιλών	-	
			IRAK-1, ARID1A,	ψ CD40, CD68, CD80 και CD163, αναστολη	49,60,	
miD 222	•		NF-κB	ενεργοποιησης των μακραφαγών, κυτταρικός	77,106,	
111R-223	.1.	.1.	112 524		107	
			ILZ,EZA	ΨIL-6, IL-8, IL-12, IL-1β και TNF-α, περιορισμος		
			ILO,ILID	φλεγμονωσους αντισρασης, ΜΑΕΙ	-	
			NLRP3	ιονοκυττάρων		
miR-296-5n		小	CDX1	μονοκοτταρών Εrk1/2 ενεονοποίηση, πορώθηση ανάπτυξης		
mm-250-5p		1	CDAI	Πολλαπλασιασμός (CDK2 ενεργοποίηση) και διάθηση		
miR-301a		$\mathbf{\Lambda}$	RUNX3	εξασθένηση TGE-β σηματοδότησης αναστολή	50	
11111-5010			NONAS			
				Αναστολή απόπτωσης πορώθηση κυτταρικού κύκλου	100.007	
miR-302a		\downarrow	BMI1 CCDC88A	μετάσταση μειωμένη επιβίωση	136,137	
miR-302h		J		Μετάσταση λεμφική μετάσταση μειωμένη επιβίωση	136	
miR-3026		 		Φλεγιμονή μετάσταση μειωμένη επιβίωση	136,138	
1111-302U		V		Αναστολή απόπτωσης πορώθηση πορωερπλαστικών	-	
miR-320	J.	J.	MCI 1	καταστάσεων μποτοοπή του όνκου	50	
1111-520	₩	V		χημειοθεοαπευτική αντίσταση		
miR-320a	J	J.	ABCG2 CTNNR1	Χημειο-αντίσταση	82	
				Επιβίωση και πολλαπλασιασμός των μεταστατικών	E0	
miR-328	\downarrow		CD44v9	κυπάρων	50	
1	1	1				

Πίνακας 3.1 συνέχεια

microRNA	НР	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ούθμιση του miRNA)		
				Φλεβική και λεμφική διήθηση, λεμφική μετάσταση,	50	
mik-335-5p		\rightarrow		κακή διαφοροποίηση		
miR-361-3p	\downarrow		CDX2		134	
	J	J	FoxM1	↓p27, προώθηση κυτταρικού κύκλου και		
miR-370	¥	v		πολλαπλασιασμός	50,61	
		\uparrow	TGFBR2	Λεμφική μετάσταση	(1.120	
miR-371-5n	\downarrow		LATS2	Προώθηση κυτταρικού κύκλου	61,139,	
		\uparrow	SOX2	Πολλαπλασιασμός, διήθηση, λεμφική μετάσταση	140	
	\downarrow		LATS2	Διακοπή κυτταρικού κύκλου G1/S, αναστολή	61,141-	
miR-372	•			ανανέωσης γαστρικού επιθηλίου	143	
		\uparrow	TNFAIP1, KIF26B	Πολλαπλασιασμός, μετάσταση		
	\downarrow		LATS2	Διακοπή κυτταρικού κύκλου G1/S, αναστολή	61,140,	
miR-373				ανανεωσης γαστρικου επιθηλιου, ΤCD44	143–	
		\uparrow	PRDM4, VIM	Αναστολή διηθήσης και μεταστάσης	145	
				Πολλαπλασιασμος		
			MDM2	Αναστολή της p53	_	
			JAK2/STAT3	Νεοπλασματικός μετασχηματισμός, πολλαπλασιασμός		
miP 275			14 2 2 zota	και μεταναστεύση	50,61	
1111-375	\mathbf{V}	\mathbf{V}	14-5-5 Zela		-	
			FDRI	$\Delta \mu$ 18 μ 6 TNE α και διάθησης ομδετεροφάλων και		
			IL8, IL12A, TNFA	η πε-τρ, πε-ό, παρ-ά και διησησης σοσειεροφιλών και		
				Επαγωνή μέσω μεθυλίωσης ζης νησίδων		
		J	ΙΙ 1Δ ΜΔΡΚ1	Ποοώθηση κυτταρικού κύκλου, αναστολή απόπτωσης	146-	
miR-378		\mathbf{v}	VEGE	πολλαπλασιασιώς διήθηση μετάσταση	152	
		\wedge	VEGI		-	
		1	CCNF2 Met	Ποόρδος του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιασμός	50.61	
miR-449	\downarrow	\checkmark	GMNN, SIRT1	Ανγειονένεση, διήθηση και μετάσταση	50,61	
miR-449b	J.	Y	HDAC1	Αναστολή απόπτωσης και κυτταρικής νήρανσης	61	
miR-451	*	¥ ↓	MIF	Πολλαπλασιασμός, αναστολή απόπτωσης	50,61	
	•	•		Μειώνεται σταδιακά κατά τη γαστρική καρκινογένεση		
				Σχηματισμός αποικιών, πολλαπλασιασμός, EMT,	50	
miR-490-3p	\downarrow	\checkmark	CCNB1	διήθηση, μετάσταση		
			SMARCD1	Μετάσταση, μειωμένη επιβίωση		
miR-497		\downarrow	Bcl-2	Αναστολή απόπτωσης	50	
				Ενεργοποίηση μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, ενίσχυση		
miR-501-5p		\uparrow		φαινοτύπου καρκινικών βλαστοκυττάρων (δείκτες	153	
				CD44, Lgr5)		
miR-502-5p	\uparrow		IRF-1	Μείωση απόπτωσης μέσω της ΙFN-γ	154	
miR-504		\uparrow	FOXP1	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	91	
miR-515-5n	.1.	.1.	SOC2	Μείωσητου let-7	50	
mik-919-9p	¥	¥	Mcl-1	Αναστολή απόπτωσης		
			lagged-1 Hes-1	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διήθηση,	50	
miR-524-5p		\checkmark	(Notch)	απορρύθμιση κυτταρικού κύκλου και TGF-β	50	
			(100001)	σηματοδότησης	455	
miR-532	\downarrow			↑ IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	155	
				Επάγεται από το miR-1290		
miR-584	\uparrow		FOXA1, PPP2a	Μείωση Ε-καδερίνης, ΕΜΤ	50,61	
			SMAD2	Κυτταρική διαφοροποίηση, εντερική μεταπλασία		
miR-675		\uparrow	RUNX1, p53	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αναστολή απόπτωσης	156	
miR-1289	\uparrow		Η⁺/Κ⁺-ΑΤΡάση	υποχλωριδρία	50	
miR-1290	小		FOXA1, NKRF	Μείωση Ε-καδερίνης, ΕΜΤ	50,61	
			SMAD2	Κυτταρική διαφοροποίηση, εντερική μεταπλασία		
miR-3163	\uparrow		MSH3	Μείωση DDR (MMR)	113	
miR-3178	\downarrow		TRAF3	Επαγωγή NF-κΒ	157	

πυακας 3.1 σ	υνεχεια	۲			
microRNA	HP	GC	Στόχοι	Αποτελέσματα (ρύθμιση του miRNA)	
miR-3189		\downarrow	CFL2	Πολλαπλασιασμός, μετανάστευση	158
miR-4270	\leftarrow		CD300E	Μακροφάγα: ↓προ-φλεγμονώδους απόκρισης & αντιγονοπαρουσίασης στα Τ-κυτταροτοξικά	159
miR-4308	\uparrow		SOCS3	JAK/STAT3 ενεργοποίηση	
miR-4462		\downarrow			161
miR-4496	\downarrow	\downarrow	ABCG2, CTNNB1	Χημειο-αντίσταση	82
miR-4739		\checkmark		Ρύθμιση από β-κατενίνη	162

3.3 Εκρίζωση του *Η. pylori* & miRNA

Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν αξιολογήσει τα πιθανά οφέλη της εκρίζωσης του *Hp* στην κατάσταση απορρύθμισης και μεθυλίωσης των miRNA του γαστρικού βλεννογόνου. Πράγματι, η ανώμαλη μεθυλίωση γενικά και τα επίπεδα μεθυλίωσης του *CDH1* αναφέρθηκε ότι μειώνονται μετά την εκρίζωση του *Hp*, υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση του DNA στο γαστρικό βλεννογόνο μειώνεται όταν το βακτήριο εκριζωθεί.⁶⁷ Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης τα επίπεδα μεθυλίωσης του miR-124 δεν μειώθηκαν σε άτομα με παλαιότερη λοίμωξη σε σύγκριση με ασθενείς με τρέχουσα λοίμωξη.¹²⁶ Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη μεταξύ ατόμων με *Hp*⁺ και *Hp*⁻ χρόνια γαστρίτιδα, η διαφορική έκφραση των miR-103a-3p, miR-181c-5p, miR-223-3p, miR-370-3p, miR-375 των *Hp*⁺ ατόμων, εκτός του miR-223-3p, επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα τρεις μήνες μετά την εκρίζωση του βακτηρίου.⁷⁸ Ενώ, έχει δειχθεί επίσης, ότι μετά την εκρίζωση του *Hp* τα miR-133a¹⁰⁹ και let-7c⁹³ αυξάνονται φθάνοντας στα φυσιολογικά τους επίπεδα.

Σε μια μελέτη σε γαστρικές βιοψίες πριν και μετά από την εκρίζωση του *Hp* σε ασθενείς με ιστορικό πρώιμων σταδίων γαστρικού καρκίνου και μη καρκινικών μαρτύρων διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των ογκογόνων miRNA ήταν σημαντικά υψηλότερη στους αδένες με εντερική μεταπλασία παρά στους μη-μεταπλαστικούς, ανεξάρτητα από την εκρίζωση του *Hp*. Σε καμία από τις ομάδες η εκρίζωση δεν άλλαξε σημαντικά την έκφραση των miRNA στους μεταπλαστικούς αδένες, παρά μόνο στην ομάδα ελέγχου όπου μείωσε την έκφραση του miR-223 και αύξησε αυτή του let-7d. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εκρίζωση του *Hp* βελτιώνει την απορρύθμιση των miRNA αλλά όχι στους μεταπλαστικούς αδένες, ενισχύοντας περαιτέρω το κλινικό εύρημα ότι η εντερική μεταπλασία είναι ένα λιγότερο αναστρέψιμο στάδιο κατά τη γαστρική καρκινογένεση. Σε μια άλλη μελέτη, η έκφραση των miRNA στον ορό αξιολογήθηκε σε ασθενείς με ιστορικό ενδοσκοπικά εκτεμνόμενου γαστρικού καρκίνου και μαρτύρων ίδιας ηλικίας και φύλου, πριν και ένα χρόνο μετά την εκρίζωση του *Hp* και βρέθηκε ότι μετά της εκρίζωση μειώθηκαν σημαντικά τα επίπεδα του miR-106b και αυξήθηκαν τα επίπεδα του let-7d μόνο στην ομάδα ελέγχου.⁵⁰

Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι παρά τη βελτίωση της απορρύθμισης των miRNA μετά την εκρίζωση του *Hp*, ορισμένες υποκείμενες διεργασίες, όπως οι επιγενετικές τροποποιήσεις, μπορεί να συνεχίσουν να προάγουν τη βλάβη των ιστών και να συμβάλλουν στην πρόοδο της γαστρικής καρκινογένεσης.⁵⁰ Επομένως, η εκρίζωση του βακτηρίου μπορεί να είναι μια στρατηγική για την αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων αυτών των miRNAs στο γαστρικό βλεννογόνο σε πρώιμα στάδια του γαστρικού μετασχηματισμού, μειώνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου.⁶¹

Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός και η μελέτη της έκφρασης των microRNAs στη λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori, Hp*) σε σχέση με την δραστικότητα της βακτηριακής CagA ογκοπρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες (microarrays) κι επακόλουθη βιοπληροφορική ανάλυση. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, μολύνθηκαν για 24 h επιθηλιακά κύτταρα της γαστρικής κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος AGS, με 3 ισογενή μεταλλάγματα *H. pylori,* όσον αφορά τη δραστικότητα της πρωτεΐνης CagA, στο γενετικό υπόβαθρο P12 στελεχών, ως ακολούθως: (1) Στέλεχος "ABCC" το οποίο εκφράζει πλήρως φωσφορυλιώσιμη CagA πρωτεΐνη «άγριου τύπου» με δύο μοτίβα EPIYA-C, (2) στέλεχος "ABFF" στο οποίο η CagA δε μπορεί να φωσφορυλιωθεί διότι φέρει δύο μοτίβα EPIFA-C, μετά από αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη και (3) "*cagA*-KO" (knockout) στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου της CagA. Μη-μολυσμένα AGS κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν στις ίδιες καταστάσεις επεξεργασίας αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Ακολούθησε απομόνωση mRNA και υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες.

Προσδιορίστηκε η σχετική διαφορική έκφραση των microRNAs στις μικροσυστοιχίες, με σύγκριση όλων των περιπτώσεων ανά δύο, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της έντασης του άμεσου φθορισμού. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των μοριακών μονοπατιών σηματοδότησης στα οποία συμμετέχουν τα microRNAs με δύο σχετικά λογισμικά προγράμματα. Εξετάστηκαν από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών όλα τα γονίδια που φαίνεται να ρυθμίζονται ή/και να ρυθμίζουν τα συγκεκριμένα miRNAs, ένα προς ένα, ως προς την έκφρασή τους στις διάφορες συνθήκες και ακολούθησε εκτίμηση των miRNA-mRNA αλληλεπιδράσεων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ανεύρεση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και των δικτύων στα οποία αυτές συμμετέχουν, ως τελεστές κατά τη ροή της γενετικής πληροφορίας.

Η μελέτη είχε στόχο την κατανόηση του ρόλου των microRNAs, τα οποία έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας, όσον αφορά τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και λειτουργίας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και ειδικότερα στον καρκίνο. Η επιθυμία των περισσότερων ερευνητών να βελτιωθεί η έκβαση των κλινικών καταστάσεων που επάγονται από το *Helicobacter pylori* (γαστρίτιδα, ατροφία, μεταπλασία, δυσπλασία), ακόμη και να αυξηθεί το προσδόκιμο επιβίωσης των ατόμων με γαστρικό καρκίνο, έχει οδηγήσει στη μελέτη των microRNAs, όντας γνωστή η ικανότητά τους να τροποποιούν όλα σχεδόν τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Αποκτώντας, έτσι, ιδιότητες που τα καθιστούν καταρχάς ανοσορρυθμιστικά, όσον αφορά τη λοίμωξη και εν συνεχεία ογκογόνα ή ογκοκατασταλτικά κατά τη διάρκεια της γαστρικής καρκινογένεσης. Ενώ, παράλληλα, είναι εντονότατη η έρευνα γύρω από τη χρήση τους ως βιοδείκτες ή/και σε θεραπευτικά σχήματα σε πολλούς τύπους καρκίνου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Αρχή Μεθόδου

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα microRNA των οποίων η έκφραση διαφέρει στην *Hp* λοίμωξη, αλλά και σε σχέση με την παρουσία ή την ικανότητα φωσφορυλίωσης της CagA, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS. Τα κύτταρα αυτά μολύνθηκαν με ισογενή *H. pylori* στελέχη του γενετικού υπόβαθρου P12, τροποποιημένα όσον αφορά τη δραστικότητα της πρωτεΐνης CagA, ως ακολούθως: 1. Στέλεχος "ABCC" το οποίο εκφράζει πλήρως φωσφορυλιώσιμη CagA πρωτεΐνη «άγριου τύπου» με δύο μοτίβα EPIYA-C, (2) στέλεχος "ABFF" στο οποίο η CagA δε μπορεί να φωσφορυλιωθεί διότι φέρει δύο μοτίβα EPIFA-C, μετά από αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη και (3) "*cagA*-KO" (knockout) στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου της CagA. Η παραγωγή των εν λόγω στελεχών έχει περιγραφεί προηγουμένως.¹⁶³ Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν στις ίδιες καταστάσεις επεξεργασίας.



Εικοσιτέσσερις ώρες (24h) μετά τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ενίσχυση ολικού RNA και στη συνέχεια, polyA-RNA υβριδοποίηση σε ολοκληρωμένα κυκλώματα (chips) μικροσυστοιχιών (microarrays) της ThermoFisher (GeneChip Human Transcriptome array 2.0 platform, AFFYMETRIX). Για λόγους στατιστικής σημαντικότητας, χρησιμοποιήθηκαν 3 chips για κάθε περίπτωση, δηλαδή 12 συνολικά. Ύστερα από ανάλυση με το αντίστοιχο λογισμικό και στατιστική επεξεργασία βάσει πρωτοκόλλου, παρουσιάστηκαν τα διαφορικώς εκφρασμένα γονίδια, με σύγκριση ανά ζεύγος συνθηκών. Από αυτά διαχωρίσαμε τα microRNAs κι ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση με τα λογισμικά προγράμματα DIANA (miRPath v3.0)¹⁶⁴ και INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)¹⁶⁵ της QIAGEN στο επίπεδο διαφορικής έκφρασης |FoldChange|≥ 2 και στατιστικής σημαντικότητας p-value < 5%, τα οποία χρησιμοποιούνται συχνότερα στη βιβλιογραφία^{166,167}. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συγχώνευση των αποτελεσμάτων των δύο λογισμικών προγραμμάτων. Εξετάστηκαν από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών όλα τα γονίδια που φαίνεται να ρυθμίζουν τα συγκεκριμένα miRNAs, ένα προς ένα, ως προς την έκφρασή τους στις διάφορες συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ανεύρεση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και των δικτύων στα οποία αυτές συμμετέχουν, ως τελεστές κατά τη ροή της

γενετικής πληροφορίας, ενώ, τα αντίστοιχα μοριακά μονοπάτια αναδύθηκαν από τη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)¹⁶⁸ μέσω του DIANA.

4.2 Τεχνικές

4.2.1 Χειρισμός βακτηριακών Helicobacter pylori στελεχών

4.2.1.1 Καλλιέργεια στελεχών Helicobacter pylori

Η καλλιέργεια των *Hp* στελεχών πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό Columbia Blood Agar Base (Oxoid) εμπλουτισμένο με 7% αίμα αλόγου και 1% Vitox (Oxoid), παρουσία αντιβιοτικών 10μg/mL βανκομυκίνη, 10μg/mL τριμεθοπρίμη, 104 IU/L πολυμυξίνη B, 2μg/mL αμφοτερικίνη B, 10μg/mL ναλιδικό οξύ, 30μg/mL βακιτρακίνη, 5μg/mL φλουοροκυτοσίνη (Sigma). Μετά την παρασκευή του θρεπτικού υλικού, τα τρυβλία αποθηκεύονταν στους 4°C. Πριν την καλλιέργεια, τα τρυβλία τοποθετούνταν ανάποδα μέσα σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C για 20 min με ελαφρά ανασηκωμένα τα καπάκια, ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια υγρασία. Κατόπιν, γινόταν ενοφθαλμισμός 100-150 μL βακτηριακού διαλύματος, το οποίο είχε αποψυχθεί από τους -80°C. Εν συνεχεία, οι βακτηριακές καλλιέργειες τοποθετούνταν σε ειδικά αεροστεγή επωαστικά δοχεία, παρουσία καταλύτη ανάπτυξης μικροαερόφιλων συνθηκών (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) (Campygen, Oxoid) και επωάζονταν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C για 24 ή 48 h.

4.2.1.2 Κρυο-συντήρηση στελεχών Η. pylori

Η φύλαξη των *Hp* στελεχών λάμβανε χώρα σε αμπούλες κρυο-συντήρησης (cryovials) στους -80 °C, σε θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Broth (BHIB), παρουσία 20% γλυκερόλης. Αναλυτικά, το σύνολο της μακροσκοπικά διακριτής *Hp* βιομάζας των αποικιών μιας καλλιέργειας ενός τρυβλίου επαναιωρείτο μέσα σε 1-1,8 mL BHIB με 20% γλυκερόλη σε αμπούλες κρυο-συντήρησης. Η αποθήκευση γινόταν στους -80°C.

4.2.1.3 Ταυτοποίηση *Η. pylori* με τη δοκιμασία ουρεάσης

Η δοκιμασία ουρεάσης ανιχνεύει την παρουσία *Hp* σε μία καλλιέργεια, λόγω της δραστικότητας του ενζύμου ουρεάση που συντίθεται από το βακτήριο. Η αρχή της δοκιμασίας βασίζεται στην υδρόλυση της ουρίας του γαστρικού περιεχομένου παρουσία ουρεάσης προς αμμωνία (NH₃) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), αντίδραση μέσω της οποίας το βακτήριο εξουδετερώνει το όξινο περιβάλλον του στομάχου.

Ο προσδιορισμός πραγματοποιείτο με κατεργασία μικρής ποσότητας βιομάζας καλλιέργειας σε υδατικό διάλυμα ουρίας 10% v/v, pH 6.8, παρουσία 1% v/v ερυθρού της φαινόλης ως δείκτη αλλαγής του pH. Η παρουσία του *Hp* στα δείγματα πιστοποιήθηκε με την ταχεία αλλαγή χρώματος του αντιδραστηρίου από πορτοκαλί σε κόκκινο, λόγω αύξησης του pH του διαλύματος άνω του 8,4 από την παραγόμενη NH₃.

4.2.2 Χειρισμός της AGS κυτταρικής σειράς

4.2.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς AGS

Για την πραγματοποίηση της *in vitro* πειραματικής λοίμωξης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS (ATCC[®] CRL-1739[™]), η οποία έχει χρόνο διπλασιασμού περίπου 20 h. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες καλλιεργειών των 75 cm², με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 Glutamax I (Gibco), εμπλουτισμένο με 10% βόειο ορό (Gibco), παρουσία αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (1%, Gibco) στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά πραγματοποιείτο πλύση με 10 mL στείρου φωσφορικού ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος, PBS (Gibco) και έπειτα αποκόλληση με χρήση διαλύματος θρυψίνης περιεκτικότητας 0,05% (Gibco). Η αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιωνόταν μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο και γινόταν αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού. Ακολουθούσε επαναιώρηση σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI, 10% FBS και 1% αντιβιοτικά) σε αναλογία 1:4 της αρχικής καλλιέργειας.

4.2.2.2 Κρυο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Η συντήρηση των ευκαρυωτικών AGS κυτταρικών σειρών πραγματοποιείτο στους -80°C. Συγκεκριμένα, μια φιάλη καλλιέργειας κυττάρων επιφάνειας 75 cm², με ποσοστό επικάλυψης άνω του 90%, ξεπλενόταν με 10ml PBS και ακολουθούσε θρυψινοποίηση. Μετά την αποκόλληση, τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 3ml θρεπτικού υλικού RPMI περιεκτικότητας 20% σε βόειο ορό και 5% σε DMSO. Το κυτταρικό εναιώρημα φυλασσόταν σε αμπούλες κρυο-συντήρησης (cryovials) της εταιρίας NUNC σε συνολικό όγκο 1mL. Η ψύξη των αμπουλών ήταν αργή με χρήση ειδικού δοχείου με ισοπροπανόλη, το οποίο διατηρούταν στους -80°C. Κατόπιν παρέλευσης 24h, οι αμπούλες αποθηκεύονταν σε βαθιά κατάψυξη, σε δοχεία υγρού αζώτου, στους -190 °C.

4.2.2.3 Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Ο αριθμός των AGS κυττάρων στο τελικό κυτταρικό εναιώρημα για τις ανάγκες των *in vitro* πειραμάτων επιμόλυνσής τους με κλινικά *Hp* στελέχη γινόταν με χρήση πλάκας Neubauer σε 2 ανεξάρτητα πεδία. Ειδικότερα, γινόταν ανάμιξη κυτταρικού εναιωρήματος με διάλυμα 0,4% Trypan blue σε αναλογία 1:1 και τοποθέτηση στην πλάκα. Η καταμέτρηση για την εκτίμηση του ποσοστού των νεκρών (μπλε) και των ζωντανών (άχρωμα) κυττάρων γινόταν με παρατήρηση της πλάκας Neubauer σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.

4.2.2.4 Ανίχνευση ενδεχόμενης μόλυνσης από Mycoplasma με PCR

Η δοκιμασία για την παρουσία μυκοπλάσματος στα AGS κύτταρα γινόταν σε εναιώρημα κυττάρων στο στάδιο της θρυψινοποίησης με PCR προσδιορισμό και χρήση μίγματος εκκινητών Myco-5' και Myco-3' που αναγνωρίζουν μια συντηρημένη περιοχή του 16 rDNA του συνόλου των ειδών *Mycoplasma spp.* και *Acholeplasma spp.* Οι συγκεκριμένοι εκκινητές ενισχύουν τη δημιουργία προϊόντος μεγέθους 502-520 bp, αναλόγα με το στέλεχος.¹⁶⁹ Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείτο δείγμα με προσθήκη dH₂O ενώ ως θετικός μάρτυρας δείγμα DNA από συλλογή κολπικού υγρού, μολυσμένα με *Mycoplasma sp.* σε αραίωση 1:10. Αρχικά, γινόταν συλλογή 1mL εναιωρήματος θρυψινοποιημένων AGS κυττάρων και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 13000xg για 5min. Ακολούθως, γινόταν διαδοχικά εις διπλούν αναδιάλυση του ιζήματος με 1mL PBS και επωαζόταν στους 95°C για 15 min, για την αποτελεσματική λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, γινόταν απομόνωση γενωμικού DNA, σύμφωνα με το εμπορικό πρωτόκολλο των Macherey-Nagel, ξεκινώντας

από το στάδιο της λύσης με διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης B3 και επώαση για 10 min στους 70°C.

Πίνακας 4.1	Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5′→3′)
Αλληλουχίες των εκκινητών			CGCCTGAGTAGTACGTWCGC
που χρησιμοποιήθηκαν στον	16S rDNA	NAVCO E'	TGCCTGRGTAGTACATTCGC
έλεγχο μόλυνσης από		ινιγίο-5	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC
μυκόπλασμα στην κυτταρική	Mycoplasma spp.		CGCCTGGGTAGTACATTCGC
σειρά των πειραμάτων.	Acholeplasma spp		GCGGTGTGTACAARACCCGA
		101900-5	GCGGTGTGTACAAACCCCGA

4.2.3 In vitro μόλυνση των AGS κυττάρων με Helicobacter pylori στελέχη

Η μόλυνση AGS γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με *Hp* στελέχη γινόταν σε αναλογία 100 βακτήρια ανά κύτταρο (Multiplicity of infection, MOI). Κύτταρα ($2x10^5$) επιστρώνονταν σε καλλιεργητικές πλάκες 6-πηγαδιών διαμέτρου 34,8mm και συνολικής επιφάνειας ανάπτυξης 9,5 cm² (Corning, Life Sciences), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αφήνονταν να προσκολληθούν και να πολλαπλασιαστούν. Μετά από 48 ώρες γινόταν ανανέωση θρεπτικού υλικού, απουσία αντιβιοτικών και τα κύτταρα επωάζονταν για ακόμη 2 h στον επωαστικό κλίβανο (37°C, CO₂ 5%), προ της προσθήκης βακτηρίων.

Οι καλλιέργειες βακτηρίων που θα χρησιμοποιούνταν στη μόλυνση αποψύχονταν και τοποθετούνταν σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας για 24 ώρες, προ της κυτταρικής μόλυνσης. Την ημέρα της μόλυνσης γινόταν συλλογή της βιομάζας από τις στερεές βακτηριακές καλλιέργειες και επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό (RPMI, 10% FBS), απουσία αντιβιοτικών. Ακολούθως γινόταν μέτρηση θολερότητας σε μήκος κύματος 600 nm και η τελική τιμή του διαλύματος ρυθμιζόταν σε οπτική πυκνότητα (OD) 0,740 η οποία αντιστοιχούσε επί τη βάσει προηγούμενων μετρήσεων του εργαστηρίου σε 10⁹ cfu/mL (βακτήρια/mL). Κατόπιν της τελικής ρύθμισης της συγκέντρωσης των βακτηρίων στο εναιώρημα διατηρούνταν για 1h υπό ανάδευση στους 37°C, σε πλήρες θρεπτικό υλικό υλικό έναιωρήματος σε κάθε κυψελίδα ώστε να ικανοποιείται η προαναφερθείσα αναλογία (MOI) 100 βακτηρίων ανά κύτταρο.

4.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από AGS κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με το εμπορικό RNAeasy Mini kit της Qiagen. Συνοπτικά, γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα πυκνότητας μικρότερη 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 350μL αιθανόλης περιεκτικότητας 70% για την τελική κατακρήμνιση του RNA. Το σύνολο του όγκου (700μL) διοχετευόταν σε στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 8000xg, προκειμένου το RNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσε πλύση του RNA με 350μL εμπορικού διαλύματος RW1 (ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει άλατα γουανιδίνης), επώαση για 15 min με 80 μL DNase της Qiagen, προκειμένου να αποφευχθούν επιμολύνσεις από γονιδιακό DNA, και τελικές εκπλύσεις με 350μL εμπορικού διαλύματος RW1 και 500μL 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 DEPC (διαιθυλοπυροανθρακικό), για την εξουδετέρωση των ριβονουκλεασών.

4.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης – Επιβεβαίωση ακεραιότητας RNA

Τα RNA που απομονώθηκε, ελέγχθηκε για την ακεραιότητά του, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1% αγαρόζης και ρυθμιστικό διάλυμα TBE pH 8,3 (44,5 mM Tris, 44,5 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA pH 8,0), παρουσία 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου. Ειδικότερα, εξετάστηκε η ακεραιότητα των ζωνών των 16S (1,5kb) και 23S (2,9 kb) rRNA. Τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύθηκαν και φωτογραφήθηκαν υπό ακτινοβολία υπεριώδους με το σύστημα Gel Doc (Biorad, Hercules, CA, USA).

4.3 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών (AFFYMETRIX) για το σύνολο του μεταγραφώματος επιλέχθηκαν τα microRNA που βρίσκονταν εντός των ορίων των επιπέδων διαφορικής έκφρασης |FoldChange|≥ 2 και στατιστικής σημαντικότητας p-value < 5%. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση για την ανεύρεση των κυτταρικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα miRNAs που απορρυθμίζονται, η οποία πραγματοποιήθηκε με δύο λογισμικά προγράμματα: το ελεύθερο στο διαδίκτυο DIANA-miRPath v3.0 που αναδεικνύει γονίδια-στόχους μέσω των βάσεων δεδομένων (db, DataBases) TarBasev7.0 (TB, αφορά μόνο τις πειραματικώς αποδεδειγμένες miR-mRNA αλληλεπιδράσεις)¹⁷⁰ και TargetScan (TS, προβλεπόμενες miR-mRNA αλληλεπιδράσεις)¹⁷¹ και με το INGENUITY (IPA, της Qiagen), όπου πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τα πειραματικώς αποδεδειγμένα γονίδια-στόχους από διάφορες βάσεις δεδομένων. Με το INGENUITY πραγματοποιήθηκε ανάλυση έκφρασης (expression analysis) στην οποία λαμβάνεται υπόψη και το FoldChange κάθε miRNA. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας p-value < 0,05 κι επιπλέον, για το TargetScan χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι, TargetScan Score Type = Context+ και TargetScan context score = -0,4.

Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ όλων των ομάδων ανά δύο και εστιάσαμε ειδικότερα σε τρεις. Στην ABCC vs. AGS σύγκριση όπου αναδεικνύεται η επίδραση της λοίμωξης από τα άγριου τύπου *Hp* στελέχη στην απορρύθμιση των miRNA, στην ABCC vs. ABFF στην οποία προκύπτουν οι δράσεις της φωσφορυλιωμένης CagA έναντι της δραστικότητάς της που δεν εξαρτάται από τη φωσφορυλίωσή της και τέλος, στην ABCC vs. *cagA*-KO όπου αποκαλύπτονται όλες οι δράσεις της CagA. Οι υπόλοιπες τρεις συγκρίσεις (ABFF vs. AGS, *cagA*-KO vs. AGS & ABFF vs. *cagA*-KO) αποτελούν ουσιαστικά κάποιου είδους επαλήθευσης των προαναφερθέντων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων από τα δύο λογισμικά (DIANA και INGENUITY) και επαλήθευση αυτών με τα αρχικά δεδομένα των μικροσυστοιχιών. Ακολούθησε εκ νέου ανάλυση στις βάσεις δεδομένων TarBase, microT και TargetScan μέσω του DIANA, για την εκτίμηση των miRNA-mRNA αλληλεπιδράσεων μόνο για τα γονίδια που παρουσίαζαν διαφορική έκφραση στα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών. Από τη microT-CDSv5.0 (mT) ανάλυση γίνεται πρόβλεψη των miR-mRNA αλληλεπιδράσεων βάσει συμπληρωματικότητας και στην οποία έγινε χρήση της παραμέτρου microT threshold = 0,8. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ανεύρεση των αλληλεπιδράσεων πουτείνης και των δικτύων στα οποία αυτές συμμετέχουν στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης, ενώ, τα αντίστοιχα μοριακά μονοπάτια αναδύθηκαν από την KEGG¹⁶⁸

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Αποτελέσματα από την ανάλυση των microarrays (AFFYMETRIX)

Στον παρακάτω Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών για τα διαφορικώς εκφρασμένα miRNA σε όλες τις περιπτώσεις συγκρίσεων.

Πίνακας 5.1 Διαφορική έκφραση των microRNAs των AGS κυττάρων στις διάφορες περιπτώσεις μόλυνσης με
τα ισογενή P12 <i>H. pylori</i> στελέχη (ABCC, ABFF <i>, cagA-</i> KO) σε σύγκριση με τα μη-μολυσμένα κύτταρα (AGS).
(p-value < 5%, FoldChange ≥ 2, AFFYMETRIX Human Gene 2.0 ST Array)

		FoldChange					
microRNA	Ρύθμιση	ABCC vs.	ABFF vs.	cagA-KO	ABCC vs.	ABCCvs.	ABFF vs.
		AGS	AGS	vs. AGS	ABFF	садА-КО	садА-КО
miR-let-7f-1	\uparrow	-	2,536	-	-	-	-
miR-29a	\uparrow	-	-	2,146	-	-2,158	-
miR-32	-	-1,949	-	-1,793	-2,054	-	1,889
miR-181b-1	\uparrow	1,952	1,945	2,413	-	-	-
miR-192	\downarrow	-1,782	-	-2,019	-1,642	-	1,860
miR-205	\downarrow	-2,088	-1,579	-1,800	-1,322	-	-
miR-302a	\checkmark	-3,665	-2,686	-3,342	-1,364	-	-
miR-302b	\checkmark	-5,195	-1,855	-3,480	-2,800	-1,493	1,876
miR-302c	\downarrow	-11,349	-2,078	-6,555	-5,462	-1,731	3,154
miR-302d	\checkmark	-3,879	-2,367	-2,761	-	-	-
miR-371a	\checkmark	-1,909	-1,511	-2,237	-1,264	-	1,481
miR-371b	\uparrow	2,765	1,926	8,859	-	-3,204	-4,600
miR-372	\checkmark	-2,522	-1,812	-2,896	-1,392	-	-1,598
miR-373	\checkmark	-3,254	-1,789	-3,604	-1,819	-	2,015
miR-378e	\downarrow	-	-	-2,589	-	-	-
miR-548i-1	\checkmark	-2,069	-	-1,493	-2,557	-1,386	1,845
miR-3160-1	\checkmark	-3,076	-	-	-2,305	-	-
miR-3189	\uparrow	1,765	1,813	2,471	-	-	-
miR-3193	\downarrow	-	-	-2,191	-	-	-
miR-3529	\uparrow	2,785	-	2,994	-	-	-
miR-4462	\uparrow	3,093	-	-	1,976	2,024	-
miR-4516	\checkmark	-2,441	-	-1,514	-1,900	-1,612	-
miR-4540	-	-	-	-	-	-2,258	-
miR-4677	-	-	-	-	-2,045	-	1,941
miR-4710	\downarrow	-1,944	-2,123	-	-	-	-
miR-4739	-	-	-1,980	-	-	-	-2,252
miR-4783	\uparrow	6,895	-	4,147	3,277	-	-

* Οι γκρίζες τιμές βρίσκονται εντός του επιπέδου στατιστικής σημαντικότητας (p-value< 5%) αλλά εκτός του επιπέδου σημαντικότητας διαφορικής έκφρασης (IFoldChange] ≤ 2). Δε συμμετείχαν στις ακόλουθες αναλύσεις και παρουσιάζονται μόνο για λόγους καλύτερης κατανόησης των αποτελεσμάτων.</p>

Παρατηρήθηκε πως από τα 990 συνολικά miRNAs που εξετάστηκαν, 27 παρουσιάζονται απορρυθμισμένα, με τα 15 από αυτά να είναι μειο- και τα 8 αυξο-ρυθμισμένα στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% και διαφορικής έκφρασης |FoldChange| ≥ 2, στις διάφορες

περιπτώσεις *Η. pylori* μόλυνσης, σε σύγκριση με τα μη-μολυσμένα AGS κύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα 4 είναι απορρυθμισμένα εντός των μολυσμένων ομάδων και τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

5.2 Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής Ανάλυσης

Στον παρακάτω Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα microRNA για τα οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση μονοπατιών στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων. Στο DIANA επιλέχθηκαν οι οδηγοί κλώνοι όπου ήταν εφικτό να εντοπισθούν και με τη βοήθεια της miRBase βάσης δεδομένων, ενώ στο INGENUITY επιλέχθηκαν αυτόματα από το πρόγραμμα βάσει των κοινών τους αλληλουχιών στόχευσης (miRNAseed).

microRNA (AFFYMETRIX)	DIANA	INGENUITY
miR-let-7f-1	miR-let-7f-1-3p	let-7
miR-29a	miR-29a-3p	mir-29
miR-32	miR-32-5p	mir-32, miR-92a-3p
miR-181b-1	miR-181b-3p	mir-181, miR-181a-5p
miR-192	miR-192-5p	mir-192
miR-205	miR-205-5p	mir-205
miR-302a	miR-302a-3p	mir-302, miR-291a-3p
miR-302b	miR-302b-3p	mir-302, miR-291a-3p
miR-302c	miR-302c-3p	mir-302, miR-291a-3p, mir-515
miR-302d	miR-302d-3p	mir-302, miR-291a-3p
miR-371a	miR-371a-3p	miR-292-3p
miR-371b	miR-371b-3p και miR-371b-5p	mir-290, miR-292b-5p
miR-372	miR-372-3p και miR-372-5p	mir-373, miR-291a-3p
miR-373	miR-373-3p	mir-373, miR-291a-3p
miR-378e	miR-378e	mir-378
miR-548i-1	miR-548i	mir-548, miR-548c-3p, miR-548o-3p, miR-579
miR-3160-1	miR-3160-3p	mir-3160
miR-3189	miR-3189-3p	MIR3189
miR-3193	miR-3193	mir-3193
miR-3529	miR-3529-5p	miR-379-5p, mir-3529
miR-4462	miR-4462	MIR4462
miR-4516	miR-4516	miR-4434, MIR4516
miR-4540	miR-4540	MIR4540
miR-4677	miR-4677-3p και miR-4677-5p	mir-4677
miR-4710	miR-4710	miR-4710
miR-4739	miR-4739	MIR4739, miR-6967
miR-4783	miR-4783-3p και miR-4783-3p	MIR4783

Πίνακας 5.2 Αντιστοίχιση ονοματολογίας (ID) των microRNAs μεταξύ των δεδομένων από τις μικροσυστοιχίες (Affymetrix) και των βάσεων δεδομένων που πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή τους (DIANA & INGENUITY).

5.2.1 Επίδραση της λοίμωξης στην απορρύθμιση των miR (ABCC vs AGS)

Στον ακόλουθο Πίνακα 5.3 παρουσιάζεται η διαφορική έκφραση των απορρυθμισμένων miRNA στα ABCC μολυσμένα κύτταρα έναντι των AGS μη μολυσμένων κυττάρων.

ABCC vs. AGS (AFFYMETRIX)						
microRNA	Ρύθμιση	FoldChange				
miR-205	\checkmark	-2,088				
miR-302a	\checkmark	-3,665				
miR-302b	\checkmark	-5,195				
miR-302c	\checkmark	-11,349				
miR-302d	\checkmark	-3,879				
miR-371b	1	2,765				
miR-372	\checkmark	-2,522				
miR-373	\checkmark	-3,254				
miR-548i-1	\checkmark	-2,069				
miR-3160-1	\downarrow	-3,076				
miR-3529	1	2,785				
miR-4462	1	3,093				
miR-4516	\checkmark	-2,441				
miR-4783	1	6,895				

Πίνακας 5.3 Διαφορική έκφραση των miRNAs των ABCC μολυσμένων κυττάρων σε σύγκριση με τα μη-μολυσμένα AGS κύτταρα.

> Από τα 990 miRNA που εξετάστηκαν συνολικά, τα 14 παρουσιάζονται απορρυθμισμένα στα ABCC μολυσμένα κύτταρα σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα AGS κύτταρα, με τα 10 από αυτά να είναι μειο-ρυθμισμένα (miR-205, miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-372, miR-373, miR-548i-1, miR-3160-1 & miR-4516) και τα 4 αυξορυθμισμένα (miR-371b, miR-3529, miR-4462 & miR-4783).

Στον ακόλουθο Πίνακα 5.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το DIANA για την ABCC vs AGS σύγκριση.

Πίνακας 5.4 DIANA βιοπληροφορική ανάλυση των διαφορικώς εκφρασμένων miRNAs των ABCC μολυσμένων
κυττάρων σε σύγκριση με τα μη-μολυσμένα AGS κύτταρα. (p < 5%)

ABCC vs AGS (DIANA)			
KEGG pathway	db	microRNA	genes
Lysine degradation		miR-302a	ASH1L, KMT2A, KMT2E, NSD1, SUV420H2, WHSC1L1
		miR-302b	ASH1L, KMT2E, NSD1, WHSC1L1
	ΤВ	miR-302c	ASH1L, KMT2E, NSD1, SETD7, WHSC1L1
		miR-302d	ASH1L, KMT2E, NSD1, WHSC1L1
		miR-4516	ASH1L
		miD 202a	BTRC, CCND1, CCND2, CHD8, CSNK1A1, CSNK2A2, FZD3, FZD5, FZD6, PRKACB,
What signalling		MIK-302a	ROCK2, VANGL1
Wht signalling	тв	miR-302b	BTRC, CCND1, CCND2, CSNK1A1, CSNK2A2, FZD5, FZD6,
patriway		miR-302c	BTRC, CCND1, CCND2, CSNK1A1, CSNK2A2, FZD5, FZD6, TBL1XR1
		miR-302d	BTRC, CCND1, CCND2, CSNK1A1, CSNK2A2, FZD5, FZD6, PPP3R1
	тв	miR-4783	ACTB, ACTG1, AKT1, NUDT16L1, WNT3A
Proteoglycans		miR-302a	AKT1, CCND1, EZR, FZD3, FZD5, FZD6, MAPK1, MDM2, PPP1CB, PRKACB, ROCK2
in cancer		miR-302b	AKT1, AKT2, CCND1, EZR, FZD5, FZD6, PPP1CB
		miR-302d	AKT1, CCND1, EZR, FZD5, FZD6, PPP1CB, VEGFA
	TS	miR-371b	GALNT10, WBSCR17
		miR-302a	GALNT3
Widelin type O-		miR-302b	GALNT3
biosynthesis		miR-302c	GALNT3
biosynthesis		miR-302d	GALNT3
		miR-373	GALNT3
Biotin metabol.	TS	miR-3529	HLCS

Από την ανάλυση με το DIANA για τα απορρυθμισμένα miRNA των ABCC μολυσμένων κυττάρων συγκριτικά με τα AGS μη μολυσμένα κύτταρα φαίνεται πως επηρεάζονται το μονοπάτι αποικοδόμησης της λυσίνης (από την απορρύθμιση των miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d & miR-4516), το Wnt μονοπάτι μεταγωγής σήματος (από τα miR-302a, miR-302b, miR-302c & miR-302d), η έκφραση των πρωτεογλυκανών στον καρκίνο (miR-302a, miR-302b, miR-302d & miR-4783), η βιοσύνθεση της βλεννίνης τύπου Ο-γλυκάνης (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-371b & miR-373) και ο μεταβολισμός της βιοτίνης (από την απορρύθμιση του miR-3529).

Στον παρακάτω Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το IPA για την ABCC vs AGS σύγκριση.

Πίνακας 5.5 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των διαφορικώς εκφρασμένων
miRNAs των ABCC μολυσμένων έναντι των AGS μη-μολυσμένων κυττάρων. (p < 5%)

ABCC vs AGS (INGENUITY)				
Μόρια που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων	Ασθένειες & Λειτουργίες			
AGO2, ANGPTL4, BRAF, calcifediol, CCNA1, CD44, CDH1, GFI1, HDAC4, IL6, IL32, INHBA,				
JMJD1C, MALAT1, mir-205, mir-290, mir-302, mir-373, mir-548, miR-291a-3p (and other	Κυτταρικός κύκλος,			
miRNAs w/seed AAGUGCU), miR-292b-5p (and other miRNAs w/seed CUCAAAA), miR-	κυτταρική κίνηση,			
548c-3p (miRNAs w/seed AAAAAUC), MTDH, MYC, NANOG, POU5F1, PRKACB, RECK,	κυτταρική ανάπτυξη			
resolvin D1, SOX2, TGFBR2, TMEM8B, TP53, TSH, ZEB2				

Από την ανάλυση με το INGENUITY φαίνεται πως τα miRNA που απορρυθμίζονται στα ABCC μολυσμένα κύτταρα έναντι των AGS μη μολυσμένων κυττάρων (miR-205, miR-302, miR-371b, miR-372, miR-373 & miR-548i, κατ' αντιστοιχία) συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής κίνησης και ανάπτυξης.

Εικόνα 5.1 Διάγραμμα της επίδρασης της διαφορικής έκφρασης των miRNA στις διάφορες μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες στην περίπτωση της λοίμωξης από άγριου τύπου *Hp* στελέχη (ABCC) συγκριτικά με την περίπτωση των μη-μολυσμένων κυττάρων (AGS).





Στον παρακάτω Πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα είδη των αλληλεπιδράσεων των απορρυθμισμένων microRNA με τα mRNA-στόχους αυτών κατά την ABCC vs AGS σύγκριση, οι αλληλεπιδράσεις των οποίων παρουσιάζονται σχηματικά στο παραπάνω δίκτυο (Εικόνα 5.2).

Πίνακας 5.6 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Ρυθμιστικές σχέσεις των απορρυθμισμένων miRNAs και των
μορίων που επηρεάζονται από αυτά στο μεταξύ τους δίκτυο αλληλεπιδράσεων κατά την ABCC vs AGS σύγκριση.
[ρύθμιση: από/upstream \rightarrow προς/downstream (τύπος ρύθμισης), p-value< 5%]

ABCC vs AGS (INGENUITY)				
miRNAs	ρύθμιση	μετάγραφα		
	← (έκφραση)	AGO2, calcifediol, MYC, TMEM8B, TP53		
	→ (έκφραση)	CDH1, IL32, ZEB2		
mir 205	→ (εντόπιση)	CDH1		
1111-205	→ (μεταγραφή)	IL32		
	→ (αλληλεπιδράσεις			
	πρωτεΐνης-πρωτεΐνης)			
	← (έκφραση)	INHBA, MTDH, TSH		
	→ (έκφραση)	CCNA1, PRKACB, RECK, TGFBR2		
	→ (εντόπιση)	IL6		
mir-290	\rightarrow (woinguage)	miR-291a-3p (and other miRNAs w/seed AAGUGCU),		
	> (ωριμανοη)	miR-292b-5p (and other miRNAs w/seed CUCAAAA)		
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA-	CCNA1, RECK, TGFBR2		
	RNA: microRNA στόχευση)			
	← (έκφραση)	AGO2, BRAF, GFI1, resolvin D1		
miR-291a-3p (and other	→ (έκφραση)	CD44, CDH1, PRKACB, RECK		
miRNAs w/seed AAGUGCU)	ightarrow (αλληλεπιδράσεις RNA-	CD44, PRKACB, RECK		
	RNA: microRNA στόχευση)			

Πίνακας 5.6 συνέχεια

ABCC vs AGS (INGENUITY)				
miRNAs	ρύθμιση	μετάγραφα		
miR-292b-5p (and other miRNAs w/seed CUCAAAA)	← (έκφραση)	TP53		
mir 202	← (έκφραση)	AGO2, BRAF, CD44, GFI1, INHBA, JMJD1C, MYC, NANOG, POU5F1, resolvin D1, SOX2		
1111-302	→ (έκφραση)	HDAC4		
	→ (ωρίμανση)	miR-291a-3p (and other miRNAs w/seed AAGUGCU)		
	← (έκφραση)	TP53		
	→ (έκφραση)	ANGPTL4, CD44, CDH1, IL6, TGFBR2		
	→ (εντόπιση)	IL6		
mir-373	→ (ωρίμανση)	miR-291a-3p (and other miRNAs w/seed AAGUGCU), miR-292b-5p (and other miRNAs w/seed CUCAAAA)		
	→ (ρύθμιση πρόσδεσης)	CDH1		
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA- RNA: microRNA στόχευση)	RECK, TGFBR2		
	→ (μεταγραφή)	CD44		
	← (έκφραση)	AGO2, TP53		
mir-548	→ (ωρίμανση)	miR-548c-3p (miRNAs w/seed AAAAAUC)		
miR-548c-3p (miRNAs w/seed AAAAAUC)	← (έκφραση)	ТР53		

5.2.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της CagA στην απορρύθμιση των miR (ABCC vs ABFF)

Στον παρακάτω Πίνακα 5.7 παρουσιάζεται η διαφορική έκφραση των απορρυθμισμένων miRNA στα ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων.

Αδές εναντί των Αδί η μολοσμένων κοτταρών.			
ABCC vs. ABFF (AFFYMETRIX)			
microRNA	Ρύθμιση	FoldChange	
miR-32	\checkmark	-2,054	
miR-302b	\checkmark	-2,800	
miR-302c	\checkmark	-5,462	
miR-548i-1	\checkmark	-2,557	
miR-3160-1	\checkmark	-2,305	
miR-4677	\checkmark	-2,045	
miR-4783	1	3,277	

Πίνακας 5.7 Διαφορική έκφραση των microRNAs των
ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων.

Από τα 990 miRNA που εξετάστηκαν συνολικά, τα 7 παρουσιάζονται απορρυθμισμένα στα ABCC συγκριτικά με τα ABFF μολυσμένα κύτταρα, με τα 6 από αυτά να είναι μειωμένα (miR-32, miR-302b, miR-302c, miR-548i-1, miR-3160-1 & miR-4677) και μόνο το miR-4783 αυξημένο. Στον ακόλουθο Πίνακα 5.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το DIANA για την ABCC vs ABFF σύγκριση.

ABCC vs ABFF (DIANA)			
KEGG pathway	db	microRNA	genes
Lysine	тв	miR-32	ASH1L, KMT2A, KMT2C, OGDH, SETD7, SETDB2, SUV420H1, WHSC1L1
		miR-302b	ASH1L, KMT2E, NSD1, WHSC1L1
degradation		miR-302c	ASH1L, KMT2E, NSD1, SETD7, WHSC1L1
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	тв	miR-548i-1	PTPLB
Proteoglycans in cancer	тв	miR-4783	ACTB, ACTG1, AKT1, NUDT16L1, WNT3A
		miR-32	AKT2, BRAF, CTNNB1, DDX5, DROSHA, FGF2, FRS2, ITGA5, ITGAV, ITPR1, KRAS, MDM2, NRAS, PIK3CB, PPP1R12A, PPP1R12C, PRKX, PTK2, SDC2, SOS2, SRC, TWIST1
		miR-302b	AKT1, AKT2, CCND1, EZR, FZD5, FZD6, PPP1CB
Prolactin		miR-302b	AKT1, AKT2, CCND1, CCND2, SOCS5
signalling path.	IB	miR-302c	AKT1, CCND1, CCND2, IRF1, SOCS5
Mucin type O-		miR-302b	GALNT3
Glycan biosynthesis	ΤS	miR-302c	GALNT3

Πίνακας 5.8 DIANA βιοπληροφορική ανάλυση των διαφορικώς εκφρασμένων miRNAs των ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων. (p < 0,05)

Από την ανάλυση με το DIANA για τα απορρυθμισμένα miRNA των ABCC συγκριτικά με τα ABFF μολυσμένα κύτταρα φαίνεται πως επηρεάζονται το μονοπάτι αποικοδόμησης της λυσίνης (από την απορρύθμιση των miR-32, miR-302b & miR-302c), η βιοσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (από το miR-548i-1), η έκφραση των πρωτεογλυκανών στον καρκίνο (miR-32, miR-302b & miR-4783), το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της προλακτίνης και η βιοσύνθεση της βλεννίνης τύπου Ο-γλυκάνης (από την απορρύθμιση των miR-302b & miR-302c).

Στον παρακάτω Πίνακα 5.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το IPA για την ABCC vs ABFF σύγκριση.

Πίνακας 5.9 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των διαφορικώς εκφρασμένων miRNAs των ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων. (p < 0,05)

ABCC vs ABFF (INGENUITY)				
Μόρια που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων	Ασθένειες & Λειτουργίες			
AGO2, AR, BCL2L11, beta-estradiol, BRAF, BTG2, CD44, dihydrotestosterone, GFI1, INHBA, JMJD1C, MDM2, mir-32, mir-302, mir-324, mir-548, mir-628, miR-125b-2-3p (miRNAs				
w/seed CAAGUCA), miR-194-5p (miRNAs w/seed GUAACAG), miR-291a-3p (and other miRNAs w/seed AAGUGCU), miR-515-5p (and other miRNAs w/seed UCUCCAA), miR-548c-	Οργανισμική βλάβη & ανωμαλίες,			
3p (miRNAs w/seed AAAAAUC), miR-548o-3p (and other miRNAs w/seed CAAAACU), miR- 579-3p (and other miRNAs w/seed UCAUUUG), miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC), MYC, NANOG, POU5F1, SOX2, TCF4, TLR3, TP53, tretinoin, TSC1	κυτταρικός κύκλος			

Από την ανάλυση με το INGENUITY φαίνεται πως τα miRNA που απορρυθμίζονται στα ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων (miR-32, miR-302, miR-372, miR-373 & miR-548i, κατ' αντιστοιχία) συμμετέχουν στην ανάπτυξη οργανισμικής βλάβης και ανωμαλιών και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Εικόνα 5.3 Διάγραμμα της επίδρασης της διαφορικής έκφρασης των miRNA στις διάφορες μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες στην περίπτωση της λοίμωξης από άγριου τύπου *Hp* στελέχη (ABCC) συγκριτικά με την περίπτωση των μολυσμένων κυττάρων με στελέχη στα οποία η CagA δεν έχει ικανότητα φωσφορυλίωσης (ABFF).



Στον παρακάτω Πίνακα 5.10 παρουσιάζονται τα είδη των αλληλεπιδράσεων των απορρυθμισμένων microRNA με τα mRNA-στόχους αυτών κατά την ABCC vs ABFF σύγκριση, οι αλληλεπιδράσεις των οποίων παρουσιάζονται σχηματικά στην παρακάτω Εικόνα 5.4.

Πίνακας 5.10 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Ρυθμιστικές σχέσεις των απορρυθμισμένων miRNAs και των μορίων που επηρεάζονται από αυτά στο μεταξύ τους δίκτυο αλληλεπιδράσεων κατά την ABCC vs ABFF σύγκριση. [ρύθμιση: από/upstream → προς/downstream (τύπος ρύθμισης), p-value< 5%]

ABCC vs ABFF				
miRNAs	ρύθμιση	μετάγραφα		
	← (έκφραση)	dihydrotestosterone, TLR3, tretinoin		
	🔶 (μεταγραφή)	TP53		
	→ (έκφραση)	BCL2L11, BTG2, MDM2, TSC1		
	→ (αναστολή)	BCL2L11		
mir-32	→ (εντόπιση)	TP53		
	→ (ωρίμανση)	miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC)		
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA-	DCI 2111 DTC2 MDM2 TSC1		
	RNA: microRNA στόχευση)	BCLZLII, BIGZ, WIDWIZ, ISCI		
	→ (μεταγραφή)	BCL2L11		
	← (έκφραση)	AGO2, MYC, TLR3, TP53		
	→ (έκφραση)	BCL2L11		
	→ (αναστολή)	BCL2L11		
miP 022 2n (and other	\leftrightarrow (αλληλεπιδράσεις	4603		
miRNAs w/seed ALLIGCAC)	πρωτεΐνης-RNA)	AGOZ		
minicitias w/seed adddcacj	→ (ρύθμιση πρόσδεσης)	AGO2		
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA-			
	RNA: microRNA στόχευση	BCL2L11		
	& όχι στόχευσης)			

Πίνακας 5.10 συνέχεια			
ABCC vs ABFF (INGENUITY)			
miRNAs	ρύθμιση	μετάγραφα	
	← (έκφραση)	AGO2, BRAF, GFI1	
miR-291a-3p (and other	→ (έκφραση)	CD44	
miRNAs w/seed AAGUGCU)	→ (αλληλεπιδράσεις RNA- RNA: microRNA στόχευση)	CD44	
mir-302	← (έκφραση)	AGO2, BRAF, CD44, GFI1, INHBA, JMJD1C, MYC, NANOG, POU5F1, SOX2	
	→ (ωρίμανση)	miR-291a-3p (and other miRNAs w/seed AAGUGCU)	
	← (έκφραση)	AGO2, beta-estradiol, TCF4, TP53	
	→ (έκφραση)	AR	
mir-548	→ (ωρίμανση)	miR-548c-3p (miRNAs w/seed AAAAAUC), miR-548o-3p (and other miRNAs w/seed CAAAACU), miR-579-3p (and other miRNAs w/seed UCAUUUG)	
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA- RNA: microRNA στόχευση)	AR	
miR-548c-3p (miRNAs w/seed AAAAAUC)	← (έκφραση)	ТР53	
miR-548o-3p (and other miRNAs w/seed CAAAACU)	→ (αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-RNA)	AGO2	



5.2.3 Επίδραση της CagA στην απορρύθμιση των miR (ABCC vs cagA-KO)

Στον παρακάτω Πίνακα 5.11 παρουσιάζεται η διαφορική έκφραση των απορρυθμισμένων miRNA στα ABCC έναντι των *cagA*-KO μολυσμένων κυττάρων.

ABCC εναντι των cagA-KO μολυσμενων κυτταρων.							
ABCC	ABCC vs. <i>cagA</i> -KO (AFFYMETRIX)						
microRNA	Ρύθμιση	FoldChange					
miR-29a	\checkmark	-2,158					
miR-371b	\checkmark	-3,204					
miR-4462	1	2,024					
miR-4540	\checkmark	-2,258					

Πίνακας 5.11 Διαφορική έκφραση των microRNAs των ABCC έναντι των *cagA*-KO μολυσμένων κυττάρων.

Από τα 990 miRNA που εξετάστηκαν συνολικά, τα 4 παρουσιάζονται απορρυθμισμένα στα ABCC συγκριτικά με τα *cagA*-KO μολυσμένα κύτταρα, με τα 3 από αυτά να παρουσιάζονται μειωμένα (miR-29a, miR-371b & miR-4540) και μόνο το miR-4462 αυξημένο.

Στον παρακάτω Πίνακα 5.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το DIANA για την ABCC vs *cagA*-KO σύγκριση.

Πίνακας 5.12 DIANA βιοπληροφορική ανάλυση των διαφορικώς εκφρασμένων miR	NAs
των ABCC έναντι των <i>cagA</i> -KO μολυσμένων κυττάρων. (p < 5%)	

ABCC vs cagA-KO (DIANA)						
KEGG pathway	db	microRNA	genes			
ECM-receptor interaction	тв	miR-29a	COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, HSPG2, ITGA11, ITGB5, LAMA2, LAMA5, LAMC1, LAMC2, THBS1, VWF			
	TS	miR-29a	COL11A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A4, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A3, LAMA2			
		miR-4540	COL24A1			
Fatty acid biosynthesis	тв	miR-29a	ACACA, FASN			
Viral carcinogenesis	тв	miR-29a	BAK1, BAX, CASP8, CCND2, CCNE1, CDC42, CDK6, CDKN1A, CREB3L2, CREB5, DDB1, DDX3X, HDAC4, HDAC7, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BG, HIST1H2BH, HIST1H2BM, HIST1H2BO, HIST1H4A, HIST1H4C, HIST1H4E, HIST2H2BE, HIST2H2BF, JAK1, JUN, MDM2, NRAS, PIK3R1, PIK3R3, RANBP1, REL, RELA, SKP2, SND1, TP53, TRAF5, UBR4, YWHAE, YWHAG, YWHAH			
Fatty acid metabolism	тв	miR-29a	ACACA, CPT2, FASN, HADHA, SCD			
Lysine degradation	тв	miR-29a	ASH1L, DOT1L, HADHA, NSD1, SETD2, SETD7, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, WHSC1			
Amoebiasis	ΤS	miR-29a	COL11A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A4, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, LAMA2, PIK3R2, SERPINB9			
Metabolism of		miR-29a	GSTA4, GSTO2			
xenobiotics by cytochrome P450	TS	miR-371b	GSTM4			
Mucin type O- Glycan biosynthesis	ΤS	miR-371b	GALNT10, WBSCR17			
Protein digestion and absorption	ΤS	miR-29a	COL11A1, COL15A1, COL1A2, COL21A1, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A4, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A3, COL7A1, COL9A1, ELN			
Focal adhesion	TS	miR-29a	AKT2, CDC42, COL11A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A4, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A3, IGF1, LAMA2, PIK3R2, PTEN, VEGFA			
Caffeine metabolism	ΤS	miR-29a	NAT1, XDH			

Από την ανάλυση με το DIANA για τα απορρυθμισμένα miRNA των ABCC συγκριτικά με τα *cagA*-KO μολυσμένα κύτταρα φαίνεται πως από την απορρύθμιση του miR-29a επηρεάζονται η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, το μονοπάτι αποικοδόμησης της λυσίνης, η πέψη και η απορρόφηση των πρωτεϊνών, οι εστιακές συμφύσεις και ο μεταβολισμός της καφεΐνης, καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με τους υποδοχείς της (από την απορρύθμιση των miR-29a & miR-4540), ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών από το κυτόχρωμα P450 (miR-29a & miR-371b) και η βιοσύνθεση της βλεννίνης Ο-τύπου γλυκάνης (από την απορρύθμιση του miR-371b).

Στον παρακάτω Πίνακα 5.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με το IPA για την ABCC vs cagA-KO σύγκριση.

Πίνακας 5.13 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των διαφορικώς εκφρασμένων miRNAs των ABCC έναντι των *cagA*-KO μολυσμένων κυττάρων.

ABCC vs cagA-KO (INGENUITY)						
Μόρια που συμμετέχουν στο δίκτυο	Ασθένειες & Λειτουργίες					
ADAM12, BACE1, BCL2L2, BDKRB2, CARD9, CCL8, CD276, Cdc42, COL3A1, collagen, CollagentypeIV, CTNND1, DKK1, ELN, EPHB6, ETS2, FLT3, IDO1, IL23A, INHBA, mir-29, mir-290, miR-292-3p (andothermiRNAsw/seedAGUGCCG), MTDH, NID1, NR3C2, OLR1, Rb, SCAVENGERrecentorCLASSA_SETPA1_TBX21_TIMP3_TNE_TRAF4_TSH	Κυτταρικός κύκλος, κυτταρική κίνηση, φλεγμονώδης απόκριση					

Από την ανάλυση με το INGENUITY φαίνεται πως τα miRNA που απορρυθμίζονται στα ABCC έναντι των *cagA*-KO μολυσμένων κυττάρων (miR-29a & miR-371b, κατ' αντιστοιχία) συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής κίνησης και της φλεγμονώδους απόκρισης.

Εικόνα 5.5 Διάγραμμα της επίδρασης της διαφορικής έκφρασης των miRNA στις διάφορες μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες στην περίπτωση της λοίμωξης από άγριου τύπου *Hp* στελέχη (ABCC) συγκριτικά με την περίπτωση μόλυνσης κυττάρων με στελέχη που δεν εκφράζουν την CagA πρωτεΐνη (*cagA*-KO).


Εικόνα 5.6 Σχηματική παρουσίαση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των μορίων που επηρεάζονται από τη ρύθμιση των microRNAs στα ABCC έναντι των *cagA*-KO μολυσμένων κυττάρων (INGENUITY).



Στον παρακάτω Πίνακα 5.14 παρουσιάζονται τα είδη των αλληλεπιδράσεων των απορρυθμισμένων microRNA με τα mRNA-στόχους αυτών κατά την ABCC vs *cagA*-KO σύγκριση, οι αλληλεπιδράσεις των οποίων παρουσιάζονται σχηματικά στην παραπάτω Εικόνα 5.6.

ABCC vs cagA-KO		
miRNAs	ρύθμιση	μετάγραφα
mir-29	← (έκφραση)	EPHB6, ETS2, NR3C2, Rb
	→ (έκφραση)	ADAM12, BACE1, BCL2L2, BDKRB2, CARD9, CCL8,
		CD276, Cdc42, COL3A1, collagen, Collagen type IV,
		CTNND1, DKK1, ELN, FLT3, IDO1, IL23A, mir-29,
		NID1, OLR1, SCAVENGER receptor CLASS A, SFTPA1,
		TBX21, TIMP3, TRAF4
	→ (αναστολή)	TBX21
	→ (εντόπιση)	TNF
	→ (αλληλεπιδράσεις RNA-	ADAM12, BACE1, collagen, CTNND1, DKK1, ELN,
	RNA: microRNA στόχευση)	TBX21
	→ (μεταγραφή)	ADAM12, BACE1, CTNND1
mir-290	🔶 (μεταγραφή)	TNF, TSH
	← (έκφραση)	INHBA, MTDH
	→ (ωρίμανση)	miR-292-3p (and other miRNAs w/seed AGUGCCG)
miR-292-3p (and other		TNE
miRNAs w/seed AGUGCCG)	< (εκφραση)	

Πίνακας 5.14 INGENUITY βιοπληροφορική ανάλυση. Ρυθμιστικές σχέσεις των απορρυθμισμένων miRNAs και των μορίων που επηρεάζονται από αυτά στο μεταξύ τους δίκτυο αλληλεπιδράσεων κατά την ABCC vs *cagA*-KO σύγκριση. [ρύθμιση: από/upstream → προς/downstream (τύπος ρύθμισης), p-value< 5%]



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) είναι βασικός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Το βακτήριο έχει αναπτύξει στρατηγικές προσαρμογής στο ακραίο όξινο γαστρικό περιβάλλον και διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ έχει τη δυνατότητα να παρεμβαίνει σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, τη φλεγμονώδη αντίδραση, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τη διήθηση των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται στο γαστρικό θώκο, εδραιώνοντας τη χρόνια αποίκισή του. Η γαστρική καρκινογένεση, σύμφωνα με το πρότυπο του P. Correa, είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων ξεκινώντας από τη χρόνια *Η. pylori* λοίμωξη που εξελίσσεται σε γαστρική ατροφία, μεταπλασία, δυσπλασία, οδηγώντας τελικά σε γαστρικό καρκίνο.

Η βακτηριακή ογκοπρωτεΐνη CagA αποτελεί έναν μείζονα λοιμοτοξικό παράγοντα του *Hp* και η βιολογική της δραστικότητα προσδιορίζεται από τον αριθμό επαναλήψεων των EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) μοτίβων φωσφορυλίωσης τυροσίνης στο C-τελικό άκρο της. Μετά την είσοδό της στο επιθηλιακό κύτταρο-ξενιστή, η CagA ασκεί ένα μεγάλο εύρος επιδράσεων στα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που εξαρτώνται ή όχι από τη φωσφορυλίωσή της, τροποποιώντας διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας, απώλεια των διακυτταρικών και μεταξύ κυττάρου και μεσοκυττάριας θεμέλιας ουσίας συνδέσμων, απώλεια της κυτταρικής πολικότητας, ενεργοποίηση του μονοπατιού β-κατενίνης, μιτογόνες και προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις, δράσεις που, μεταξύ άλλων, ομοιάζουν με σηματοδότηση από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.^{32,38,39}

Τα microRNA (miRNA) αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς μεταμεταγραφικής ρύθμισης, μαζί με τη μεθυλίωση του DNA και την ακετυλίωση των ιστονών, επηρεάζοντας πολλές βιολογικές διαδικασίες. Ένα και μόνο miRNA μπορεί να ρυθμίζει πολλά mRNAστόχους, ενώ έχουν περιγραφεί περισσότερα από 2.500 miRNA στον άνθρωπο,^{71,72} πολλά από τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο και πολλά περισσότερα των οποίων οι λειτουργίες είναι ακόμη άγνωστες. Η απορρύθμιση της έκφρασής τους οδηγεί στη διατάραξη των βιολογικών διεργασιών που ελέγχουν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Τα microRNA φαίνεται πως επηρεάζουν την παθολογία της *H. pylori* λοίμωξης μέσω της ρύθμισης της έκφρασης ποικίλων γονιδίων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και την ογκογένεση. Τα miRNA που απορρυθμίζονται κατά την *Hp* λοίμωξη πιθανώς εμπλέκονται στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), ενώ αρκετά από αυτά συχνά παρουσιάζουν διαφορική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα, εκδηλώνοντας τις δράσεις τους είτε ως ογκογόνα είτε ως ογκοκατασταλτικά.^{50,70}

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των microRNA που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης με *Η. pylori* στελέχη και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία αυτά εμπλέκονται. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίσθηκε με μικροσυστοιχίες (microarrays) η σχετική διαφορική έκφραση των miRNA σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (κυτταρική σειρά γαστρικού αδενοκαρκινώματος), σε συνθήκες μόλυνσης με ισογενή *Η. pylori* P12 στελέχη. Τα στελέχη αυτά εξέφραζαν τη βακτηριακή ογκοπρωτεΐνη CagA είτε «άγριου τύπου» (ABCC), είτε με αδυναμία φωσφορυλίωσης (ABFF) ή δεν την εξέφραζαν καθόλου (*cagA*-KO, knockout), ενώ AGS μη-μολυσμένα κύτταρα που υποβλήθηκαν στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας κι επεξεργασίας αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Εν συνεχεία, με βιοπληροφορική ανάλυση μελετήθηκαν τα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχουν τα απορρυθμισμένα miRNA καθώς και τα mRNA-στόχοι αυτών που εμπλέκονται στα μονοπάτια αυτά, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Συνολικά εξετάστηκαν 990 miRNA. Συγκριτικά με τα αμόλυντα AGS κύτταρα, στα ABCC μολυσμένα 10 miRNA παρουσίασαν μειωμένη έκφραση (miR-205, miR-302a,b,c,d, miR-372, miR-373, miR-548i-1, miR-3160-1 & miR-4516) και 4 αυξημένη (miR-371b, miR-3529, miR-4462 & miR-4783). Στα στα ABFF μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα, 4 miRNA παρουσίασαν μειωμένη έκφραση (miR-302a,c,d & miR-4710) και μόνο το miR-let-7f-1 ήταν αυξημένο. Τέλος στα επιθηλιακά κύτταρα που μολύνθηκαν με το *cagA*-KO στέλεχος 10 miRNA παρουσίασαν μειωμένη (miR-192, miR-302a,b,c,d, miR-371a, miR-372, miR-373, miR-378e & miR-3193) και 6 αυξημένη έκφραση (miR-29a, miR-181b-1, miR-371b, miR-3189, miR3529 & miR-4783). Από τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων καταστάσεων μολυσμένων κυττάρων για τη διαφορική έκφραση των miRNAs πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα. Κατά την ABCC vs ABFF σύγκριση, 6 miRNA παρουσίασαν μειωμένη έκφραση (miR-32, miR-302b,c, miR-548i-1, miR-3160-1 & miR-4677) και μόνο το miR-4783 ήταν αυξημένο. Στην ABCC vs *cagA*-KO, 3 miRNA ήταν μειωμένα (miR-29a, miR-371b & miR-4540) και μόνο το miR-4462 ήταν αυξημένο και τέλος, στην ABFF vs *cagA*-KO σύγκριση, 2 miRNAs παρουσίασαν μειωμένη έκφραση (miR-371b & miR-4739) και 2 αυξημένη (miR-302c & miR-373).

Από την παρούσα εργασία, φαίνεται πως η διαφορική έκφραση των miR-181b-1, miR-205, miR-302a, miR-371a, miR-372, miR-373 και miR-3189 είναι αποτέλεσμα της λοίμωξης αυτής καθεαυτής και ανεξάρτητη της δραστικότητας της CagA, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιες μεταβολές στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η CagA μέσω ενεργοποίησης του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα αναστέλλει την έκφραση των miR-372 και miR-373.⁶¹ Τα miR-302b, miR-302c και miR-302d επίσης απορρυθμίζονται και συγκεκριμένα μειώνονται από όλα τα Hp στελέχη, όμως η μείωση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση μόλυνσης με τα ABCC στελέχη, υποδεικνύοντας πως η φωσφορυλιωμένη CagA ασκεί συνεργιστική δράση με άλλους λοιμοτοξικούς παράγοντες του βακτηρίου στη ρύθμιση αυτών των miRNA. Η αναστολή της έκφρασης του miR-4710 εξαρτάται μάλλον από τη δραστικότητα της CagA γενικότερα, αφού παρουσιάζεται μειωμένο και στις δύο περιπτώσεις μόλυνσης με CagA⁺ στελέχη (ABCC & ABFF vs AGS). Αντίθετα, η διαφορική έκφραση των miR-548i-1, miR-3160-1, miR-4462 και miR-4516 φαίνεται να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της CagA, καθώς μεταβάλλονται μόνο κατά την ABCC μόλυνση, όπως και των miR-32 και miR-4540 των οποίων η έκφραση απορρυθμίζεται στην ABCC συνθήκη συγκριτικά με τις ABFF και cagA-KO, αντίστοιχα. Σχετικά με τα miR-29a, miR-192, miR-378e και miR-3193 παρουσιάζονται απορρυθμισμένα μόνο στην περίπτωση μόλυνσης με τα cagA-knockout στελέχη (cagA-KO vs AGS), υποδεικνύοντας το ρόλο και άλλων λοιμοτοξικών παραγόντων του *Η. pylori* στη ρύθμιση των miRNA, των οποίων όμως η δράση πιθανώς αναστέλλεται από την παρουσία της CagA. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με το miR-371b, με τη διαφορά ότι μειώνεται σε όλες τις συνθήκες μόλυνσης, πολύ περισσότερο όμως στην cagA-KO. Επιπλέον, τα miR-3529 και miR-4783 απορρυθμίζονται στις περιπτώσεις μόλυνσης με στελέχη που φέρουν την CagA με δυνατότητα φωσφορυλίωσης και με στελέχη που δεν εκφράζουν καθόλου CagA (ABCC & cagA-KO vs AGS), ενώ, ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάζονται για τα let-7f-1 και miR-4739, όπου φαίνεται να απορρυθμίζονται μόνο κατά τη λοίμωξη με στελέχη που φέρουν CagA, αλλά που δε φωσφορυλιώνεται στις τερματικές θέσεις φωσφορυλίωσης EPIYA-C (ABFF vs AGS), αναδεικνύοντας ίσως, τις δράσεις της CagA που δεν εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωσή της, στη ρύθμιση αυτών των miRNA.

Σχετικά με τα μοριακά μονοπάτια στα οποία φαίνεται να συμμετέχουν τα γονίδια που ρυθμίζονται από τα απορρυθμισμένα microRNA, στα ABCC και *cagA*-KO μολυσμένα κύτταρα συγκριτικά με τα AGS μη-μολυσμένα, φαίνεται πως επηρεάζονται, μεταξύ άλλων, τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τον καρκίνο και πιο συγκεκριμένα με την έκφραση των πρωτεογλυκανών στον καρκίνο, επηρεάζεται επίσης, η σηματοδότηση από οιστρογόνα, η σηματοδότηση που σχετίζεται με την οδό μεταγωγής σήματος των ΜΑΡΚ και της GnRH, καθώς και η κυτταρική απόκριση στα λιπίδια και τα αντιβιοτικά. Διαφορές παρουσιάζονται στα ABCC έναντι των ABFF μολυσμένων κυττάρων, όπως στην GnRH σηματοδότηση, το μεταβολισμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο.

Παρατηρήθηκε, παραδόξως, πως η απορρύθμιση των miRNA και κατ' επέκταση των αντίστοιχων μονοπατιών μεταγωγής σήματος στην *cagA*-KO περίπτωση μόλυνσης ήταν παρόμοια με αυτήν στην περίπτωση της ABCC μόλυνσης. Ενώ, θα περίμενε κανείς πως η απορρύθμιση αυτή θα ήταν κλιμακούμενη από την ABCC, στην ABFF κι από εκεί στην *cagA*-KO λοίμωξη. Φαίνεται, δηλαδή, πως η λοίμωξη παρουσία της CagA η οποία δεν ασκεί τη δράση της ως φωσφορυλιωμένη (ABFF) είχε πιο ήπια αποτελέσματα στην απορρύθμιση των miRNA από τη λοίμωξη απουσία της CagA (*cagA*-KO). Τα αποτελέσματα στην απορρύθμιση των miRNA από τη λοίμωξη απουσία της CagA (*cagA*-KO). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς αντικατοπτρίζουν τις δράσεις άλλων βακτηριακών λοιμοτοξικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζονται ή/και μπλοκάρονται από την CagA. Όπως για παράδειγμα, έχει αναφερθεί πως η VacA ρυθμίζεται εν μέρει από την CagA ασκώντας διαφορικές επιδράσεις σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική βλάβη των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων κατά τη λοίμωξη, κι επιπλέον η CagA αναστέλλει την ενδοκυττάρωση της VacA μειώνοντας την ικανότητά της να σχηματίζει κενοτόπια και να επάγει την απόπτωση.^{22,47} Ο παραπάνω ισχυρισμός είναι αναγκαίο να ελεγχθεί και στην περίπτωση των miRNA, πρωτίστως δε, χρειάζεται να προσδιορισθεί εάν οι μηχανισμοί δράσης της CagA που πιθανώς ρυθμίζουν άλλους βακτηριακούς λοιμοτοξικούς παράγοντες εξαρτώνται ή όχι από τη νρωσφορυλίωσή της.

Από πολλούς συγγραφείς αναφέρεται πως το let-7f των κυκλοφορούντων εξωκυτταρικών κυστιδίων (EV, extracellular vesicles) του γαστρικού βλεννογόνου ή/και του ορού είναι αυξημένο στην Ηρ λοίμωξη και στο γαστρικό καρκίνο συγκριτικά με τους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες, αναστέλλοντας τη διήθηση και τη μετάσταση⁸⁷⁻⁸⁹, ενώ σε μία μόνο μελέτη φαίνεται πως το ίδιο miRNA μειώνεται στα επιθηλιακά κύτταρα του άντρου ως απόκριση στη λοίμωξη, προωθώντας την κυτταρική διήθηση⁷⁸. Το miR-29a παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στο γαστρικό καρκίνο, με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση.^{50,95-100} Έχει δειχθεί πως υπερεκφράζεται, μεταξύ άλλων miRNAs, ειδικότερα στο άντρο του στομάχου συγκριτικά με άλλους ιστούς, δημιουργώντας ένα μοναδικό πρότυπο έκφρασής τους στη συγκεκριμένη ανατομική θέση.¹⁷² Επίσης, έχει δειχθεί πως διάφοροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs, single nucleotide polymorphisms) του miR-29a αλλά και η γενετική ποικιλομορφία κάποιων ογκογόνων γονιδίωνστόχων του συσχετίζονται τόσο με το διάχυτο τύπο γαστρικού καρκίνου όσο και με τη βαρύτητα των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων.¹⁷³ Το miR-32 φαίνεται πως υπερεκφράζεται στο γαστρικό καρκινικό ιστό συγκριτικά με τον παρακείμενο μη καρκινικό ιστό, ενώ βρέθηκε και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ορό ατόμων με γαστρικό καρκίνο σε σχέση με υγιών μαρτύρων. Στην εν λόγω μελέτη αναφέρεται ως ογκογόνο miRNA καθώς φαίνεται να προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.¹⁰⁵ Ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα αναφέρονται σε μια άλλη μελέτη όπου φαίνεται πως το miR-32 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μετάσταση σε μια κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου.¹⁰⁴ Η ασυμφωνία αυτή των αποτελεσμάτων πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική πειραματική διάταξη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε ή/και στα πειραματικά μοντέλα, καθώς διαφορετικές κυτταρικές σειρές ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες συνθήκες επεξεργασίας. Το miR-181b αναφέρεται πως αυξάνεται στα κύτταρα γαστρικού καρκίνουκαι στην Ηρ λοίμωξη με αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), τη φλεγμονώδη καρκινογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση.^{50,116,117,120,121} Σε άλλες μελέτες επικρατεί η άποψη πως το miR-181b μειώνεται στις περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης, την αύξηση της γλυκόλυσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. 50,118,119

Το miR-192 παρουσιάζεται αυξημένο στο γαστρικό καρκίνο επιδρώντας στην κυτταρική πολικότητα και τους στενοσυνδέσμους και προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση, φαίνεται δηλαδή πως πρόκειται για ένα ογκογόνο miRNA.¹²²⁻

Επιπλέον, από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως τα miR- $205^{132,133}$ και miR- $302^{136-138}$ παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στο γαστρικό καρκίνο, χωρίς ωστόσο να βρέθηκαν αναφορές που να τα συνδέουν με την H. pylori λοίμωξη. Η μείωση του miR-205 συσχετίζεται με την ΕΜΤ μετατροπή και τη μετάσταση^{132,133} και της οικογένειας των miR-302 με αναστολή της απόπτωσης, προώθηση του κυτταρικού κύκλου, φλεγμονή κι επίσης, με τη μετάσταση¹³⁶⁻¹³⁸. Τα miR-372 και miR-373 παρουσιάζονται μειωμένα στην Η. pylori λοίμωξη ως αποτέλεσμα της δράσης της CagA, με επακόλουθο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1/S και την αύξηση του CD44 δείκτη βλαστικότητας, ενώ παρουσιάζονται ιδιαιτέρως αυξημένα στο γαστρικό και άλλους τύπους καρκίνου.^{61,140-145} Τα miR-372 και miR-373 είναι ίσως τα αφθονότερα microRNA στα κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος, όπως και στο πειραματικό μας μοντέλο, τα AGS κύτταρα, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ μειώνονται ταχέως μετά την Ηρ μόλυνση διακόπτοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των διαιρούμενων γαστρικών κυττάρων. Η μείωση αυτών των miRNA ίσως σχετίζεται με την αναστολή ανανέωσης του γαστρικού επιθηλίου, έναν μείζονα αμυντικό μηχανισμό ως απόκριση στη βακτηριακή λοίμωξη.¹⁴³ Το miR-371a φαίνεται να αποτελεί έναν αρκετά ευαίσθητο ορολογικό δείκτη, ο οποίος μάλλον υπερτερεί του συνδυασμού πρωτεϊνικών δεικτών που χρησιμοποιούνται σήμερα, στην περίπτωση του καρκίνου των γεννητικών κυττάρων του όρχεως, καθώς συσχετίζεται θετικά με τη βαρύτητα της νόσου και αρνητικά με την έκβαση της θεραπευτικής προσέγγισης, ενώ δεν εκφράζεται στην περίπτωση του τερατώματος.¹⁷⁵ Η αύξηση του miR-371b σε κυψελώδη πνευμονικά κύτταρα ενεργοποιεί το PI3K/Akt μονοπάτι μέσω άμεσης στόχευσης της PTEN φωσφατάσης, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση.¹⁷⁶ Τα miR-371a, miR-371b, miR-372 και miR-373 εδράζονται στον ίδιο γονιδιακό τόπο κι επομένως ανήκουν στην ίδια ομάδα, όμως τα miR-371a,b και miR-372/373 διαχωρίζονται μεταξύ τους ως προς τα γονίδια στόχους τους, καθώς φέρουν διαφορετικές αλληλουχίες στόχευσης (seed sequences), ενώ τα miR-302a,b,c,d και miR-372/373 ανήκουν στην ίδια οικογένεια διότι φαίνεται πως αναστέλλουν τα ίδια mRNA-στόχους.^{71,72}

Σχετικά με την οικογένεια των miR-378 αναφέρεται άλλοτε πως μειώνονται στα καρκινικά κύτταρα του στομάχου¹⁴⁶⁻¹⁵⁰ και άλλοτε πως αυξάνονται στα ίδια κύτταρα ή/και στον ορό ασθενών με γαστρικό καρκίνο^{151,152}, συγκριτικά με αντίστοιχα υγιή δείγματα. Από την αποκάλυψη των mRNAστόχων των miR-378 φαίνεται πως πρόκειται για οικογένεια ογκοκατασταλτικών miRNA,¹⁴⁶⁻¹⁵⁰ χωρίς όμως να έχουν μέχρι στιγμής βρεθεί αναφορές, ειδικότερα για το miR-378e. Σε μια μελέτη, από RNA σάρωση (screening) στα αρχικά στάδια του κολικού αδενοκαρκινώματος φάνηκε πως τρία μέλη της οικογένειας των miR-548, συμπεριλαμβανομένου του miR-548i, παρουσιάζουν διαφορική έκφραση και σχετίζονται με μονοπάτια που ενέχονται στη δημιουργία καρκίνου και ειδικότερα με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα το miR-548i είναι μάλλον ρυθμιστής του *COL11A1* και παρουσιάστηκε μειο-ρυθμισμένο στη συγκεκριμένη μελέτη, υποδεικνύοντας το ρόλο του ως ογκοκατασταλτικό miRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου.¹⁷⁷ Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η IFN-λ1 αποτελεί άμεσο στόχο των miR-548, και του miR-548i, τα οποία όμως μειο-ρυθμίζονται ενδογενώς κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων σε ηπατικά κύτταρα, καταστέλλοντας τον ιικό πολλαπλασιασμό.¹⁷⁸

Σε μια μελέτη σε κυτταρική σειρά από καρκίνο του προστάτη ανεδείχθη η υπερέκφραση του miR-3160 η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και την ανάσχεση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού¹⁷⁹, ενώ σε μια άλλη μελέτη φαίνεται πως το ίδιο miRNA βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση στα εξωκυτταρικά κυστίδια σε δείγματα ούρων ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα υγιών μαρτύρων¹⁸⁰. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε μείωση του miR-4783 στα εξωκυτταρικά κυστίδια από ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και του προστάτη.¹⁸⁰ Το miR-4783 φαίνεται, ακόμη, πως αναστέλλει την έκφραση της MMP9 καθώς αποτελεί άμεσο στόχο του.¹⁸¹ Από τους Sougleri *et al.* αναφέρεται πως οι MMP-3 και MMP-9 μεταλλοπρωτεϊνάσες αυξορρυθμίζονται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα κατά την *Hp* λοίμωξη.³⁶ To miR-3189 έχει αναφερθεί πως μειώνεται σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου και σε εγκεφαλικούς καρκινικούς ιστούς διαφόρων τύπων κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων.^{158,182} Το miR-3529 αναφέρεται πως στοχεύει αρκετά mRNA των οποίων τα παράγωγα συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης των ΜΑΡΚ, αλλά ο ρόλος του δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.¹⁸³ Η ανάλυση των miRNAs ασθενών με γαστρικό καρκίνο από το Θιβέτ, έδειξε πως το miR-4462 είναι μειωμένο στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με μη καρκινικά του παρακείμενου ιστού.¹⁶¹ Σχετικά με το miR-4516, έχει δειχθεί πως είναι αυξημένο στα καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος και στο θυλακικό θηλωματώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.^{184,185} Πρόκειται μάλλον, για ένα ογκογόνο miRNA το οποίο στοχεύει τις PTPN14 και CDKN1A, ενώ η μείωσή του έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης του όγκου και την επαγωγή της απόπτωσης.¹⁸⁵ Αντίθετα, μελέτες σε ψωριασικά κερατινοκύτταρα δείχνουν πως το miR-4516 καταστέλλει την κυτταρική κίνηση και τον πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών, ενώ, φαίνεται ακόμη πως επάγει την αυτοφαγία και την απόπτωση σε κύτταρα πνευμονικού αδενοκαρκινώματος. 186-188

Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του miR-4710 στα κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινωματώδους ιστού σε σύγκριση με τον παρακαρκινικό του ιστό.¹²⁵ Επίσης, το miR-4710, μεταξύ άλλων, φαίνεται πως υπερμεθυλιώνεται στις CpG νησίδες του γονιδίου του σε κύτταρα γλοιώματος με *IDH1* μετάλλαξη, χωρίς όμως να παρατηρείται περαιτέρω μείωση της έκφρασής του¹⁸⁹, ενώ φαίνεται ακόμη πως ένας άμεσος στόχος του είναι η HDAC4 απακετυλάση¹⁹⁰. Τέλος, το miR-4739 φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από τη β-κατενίνη και παρουσιάζεται μειωμένο στο γαστρικό καρκίνο. Η ρύθμιση αυτή, μεταξύ άλλων, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης, την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διήθησης των καρκινικών κυττάρων.¹⁶² Σχετικά με τα miR-3193, miR-4540 και miR-4677 δε βρέθηκαν αναφορές στη βιβλιογραφία.

Ως επί το πλείστον, θεωρείται πως τα miRNA που αυξο-ρυθμίζονται κατά την *H. pylori* λοίμωξη ασκούν ογκογόνο δράση, ενώ αυτά που μειο-ρυθμίζονται είναι ογκοκατασταλτικά.⁵⁰ Όπως παρατηρείται από τη βιβλιογραφία, κάποια miRNA εμφανίζονται άλλοτε αυξο- και άλλοτε μειορυθμισμένα στις διάφορες μελέτες, με ογκογόνο και ογκοκατασταλτική δράση, αντίστοιχα. Ο διττός αυτός ρόλος κάποιων miRNAs αντικατοπτρίζει το πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων στο οποίο λαμβάνουν μέρος, ενώ εξαρτάται και από το βιολογικό σύστημα το οποίο μελετάται. Είναι απαραίτητο, επίσης, να τονισθεί πως στις περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με το γαστρικό καρκίνο δεν έχει προηγηθεί έλεγχος για την ύπαρξη ή όχι *H. pylori* λοίμωξης, κι επομένως δεν είναι ξεκάθαρο αν τα αποτελέσματα που αφορούν στην απορρύθμιση των microRNA είναι αποτέλεσμα του καρκίνου ή/και της λοίμωξης. Επιπλέον, αρκετές μελέτες πάνω στην *Hp* λοίμωξη, όπως και η παρούσα, πραγματοποιούνται σε καρκινικά κύτταρα και ως συνέπεια αυτού υπάρχει επιφυλακτικότητα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, σχετικά με το αν η απορρύθμιση αυτή οφείλεται στην ίδια τη λοίμωξη ή αν αποτελεί απόκριση του κυττάρου σε αυτήν ή/και στον καρκινικό φαινότυπο.

Ως συνέχεια της παρούσας εργασίας, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν πειράματα επικύρωσης (validation) των αποτελεσμάτων απορρύθμισης των microRNAs με κάποια άλλη μεθοδολογία, όπως για παράδειγμα με PCR ή/και RNA-sequencing. Βαθύτερη βιοπληροφορική ανάλυση επί του συνόλου του μεταγραφώματος θα δώσει πιο ξεκάθαρη εικόνα για τη ρύθμιση των

μοριακών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση στις διάφορες συνθήκες μόλυνσης. Εν συνεχεία, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν πειράματα πρωτεωμικής (Western), για την επιβεβαίωση των παραπάνω σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ενώ, τέλος, θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν τα ίδια ακριβώς πειράματα *in vivo* ή/και σε πρωτογενείς (primaries) καλλιέργειες γαστρικών κυττάρων ώστε να είναι δυνατή η διάκριση των απορρυθμισμένων miRNA και των καταρροϊκών αυτών μοριακών μονοπατιών που ελέγχουν, σε οφειλόμενα στον καρκίνο ή/και στην *H. pylori* λοίμωξη ή ακόμη και στην κυτταρική απόκριση σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<u>ΕικόνεςΕξωφύλλου</u>:

(Αριστερά) Kelleher D. *Helicobacter pylori* in caltured gastric epithelial cell. *"Helicobacter pylori Camouflage and stealth."* 2000. http://www.irishscientist.ie/2000/contents.asp?contentxml=037Bs.xml&contentxsl=insight3.xsl.

(Δεξιά) Max Planck Society. Helicobacter pylori causes gene activity in the gastric cells resembling the activity of

cancer cells. MedicalXpress. https://medicalxpress.com/news/2015-06-helicobacter-pylori-gene-gastric-cells.html. Published 2015.

- 1. Marshall BJ & Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311–1315.
- 2. Παναγιωτοπούλου Ε. Προσδιορισμός του Αριθμού & του Τύπου των Θέσεων ΕΡΙΥΑ στην Πρωτεΐνη CagA του Helicobacter pylori στον Ελληνικό Πληθυσμό. Μελέτη της Επίπτωσής τους στη Λειτουργία Μορίων που Ελέγχουν τη Δομή & τη Μεταγωγή Σήματος των Εστιακών Συνδέσμων (Focal Adhesions). 2013.
- 3. Amieva M & Peek RM. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2016;150(1):64-78. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.004
- 4. Carneiro F. World cancer report 2014. *WHO Press Int Agency Res Cancer*. 2014.
- 5. Wunder C, Churin Y et al. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med*. 2006;12(9):1030-1038. doi:10.1038/nm1480
- 6. Gobert AP, McGee DJ et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(24):13844-13849. doi:10.1073/ pnas.241443798
- Foegeding NJ, Caston RR et al. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6). doi:10.3390/toxins8060173
- Smolka AJ & Schubert ML. *Helicobacter pylori*-Induced Changes in Gastric Acid Secretion and Upper Gastrointestinal Disease. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:227-252. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_10
- Figueiredo C, Camargo MC et al. Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:277-304. doi:10.1007/978-3-319-50520-6 12
- 10. Burkitt MD, Duckworth CA et al. *Helicobacter pylori* -induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech*. 2017;10:89-104. doi:10.1242/dmm.027649
- 11. Noto JM, Gaddy JA et al. Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2013;123(1):479–492. doi:10.1172/JCI64373
- 12. Bauer B & Meyer TF. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. 2011;2011:1-23. doi:10.1155/2011/340157
- 13. Kheyre H, Morais S et al. The occupational risk of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Int Arch Occup Environ Heal*. 2018. doi:10.1007/s00420-018-1315-6
- 14. De Vries AC & Kuipers EJ. Review article: *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(2):25-35. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03475.x
- 15. Καραγιάννης Γ. «Μελέτη της επαγωγής της έκφρασης μεταλλοπρωτεϊνασών του ιστού κατά τη λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού». Στρωμελυσίνη 1 και επαγωγή του φαινομένου Επιθηλιακής προς Μεσεγχυματική Μετατροπή (Epithelial to Mesenchymal Transition-EMT). 2017.
- 16. Guiney DG, Hasegawa P & Cole SP. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect Immun*. 2003;71:4163-4166.
- 17. Gyulai Z, Klausz G et al. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw.* 2004;15:353-358.
- 18. Hafsi N, Voland P et al. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J Immunol*. 2004;173:1249-1257.
- 19. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martinez-Gonzalez B, Eriotou E et al. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by Lactobacillus casei strain Shirota. *Appl Env Microbiol*. 2004;70:518-526.
- 20. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Martinez-Gonzalez B, Petraki K, Michopoulos S & Mentis A. Lactobacillus johnsonii La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:1378-1386.
- 21. Guo CY, Wu YB et al. Clinical evaluation of four one-week triple therapy regimens in eradicating *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2004;10:747-749.
- 22. Robinson K, Letley DP & Kaneko K. The Human Stomach in Health and Disease: Infection Strategies by *Helicobacter pylori*. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:1-26. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_1
- 23. Kusters JG, Gerrits MM et al. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*. 1997;65:3672-3679.
- 24. O'Toole PW, Lane MC & Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect*. 2000;2:1207-1214.
- 25. Boneca IG, de Reuse H et al. A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:1704-1714.
- 26. Heuermann D & Haas R. Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori. Gene.* 1995;165:17-24.
- Lee J & O'Rourke A. *Helicobacter pylori* (TEM). flipper.diff.org/appitemsaccount/item/info/6939.
 Alvarga Martinga CE & Christia PL Biological diversity of prokanyotic type IV correction systems. *Microbiol Mol Biol* 5
- 28. Alvarez-Martinez CE & Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2009;73(4):775-808. doi:10.1128/MMBR.00023-09
- 29. Cascales E, Atmakuri K et al. DNA substrate-induced activation of the Agrobacterium VirB/VirD4 type IV secretion system. J Bacteriol. 2013;195(11):2691-2704. doi:10.1128/JB.00114-13
- 30. Varga MG & Peek RM. DNA Transfer and Toll-like Receptor Modulation by *Helicobacter pylori*. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:169-193. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_8
- Bergé C & Terradot L. Structural Insights into Helicobacter pylori Cag Protein Interactions with Host Cell Factors. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori. Cham: Springer International Publishing;

2017:129-147. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_6

- 32. Backert S, Schmidt T et al. Exploiting the Gastric Epithelial Barrier: *Helicobacter pylori*'s Attack on Tight and Adherens Junctions. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:195-226. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_9
- 33. Lee JL & Streuli CH. Integrins and epithelial cell polarity. J Cell Sci. 2014;127(Pt 15):3217-3225. doi:10.1242/jcs.146142
- 34. Manninen A. Epithelial polarity-generating and integrating signals from the ECM with integrins. *Exp Cell Res.* 2015;334(2):337-349. doi:10.1016/j.yexcr.2015.01.003
- 35. Murata-Kamiya N, Kikuchi K et al. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe*. 2010;7(5):399-411. doi:10.1016/j.chom.2010.04.005
- 36. Sougleri IS, Papadakos KS, Zadik MP, Mavri-Vavagianni M, Mentis AF & Sgouras DN. *Helicobacter pylori* CagA protein induces factors involved in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in infected gastric epithelial cells in an EPIYA-phosphorylation-dependent manner. *FEBS J.* 2016;283(2):206-220. doi:10.1111/febs.13592
- 37. Safari F, Murata-Kamiya N et al. Mammalian Pragmin regulates Src family kinases via the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motif that is exploited by bacterial effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14938-14943. doi:10.1073/pnas.1107740108
- 38. Mueller D, Tegtmeyer N 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. *J Clin Investig*. 2012;122(4):1553-1566. doi:10.1172/JCl61143
- 39. Suzuki M, Mimuro H et al. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe*. 2009;5:23-34. doi:10.1016/j.chom.2008.11.010
- 40. Shimoda A, Ueda K et al. Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci Rep*. 2016;6:18346. doi:10.1038/srep18346
- 41. Nesic D, Miller MC et al. *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(1):130-132.
- 42. Tsang YH, Lamb A et al. *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*. 2010;29(41):5643-5650. doi:10.1038/onc.2010.304
- 43. Kaplan-Turkoz B, Jimenez-Soto LF et al. Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(36):14640-14645. doi:10.1073/pnas. 1206098109
- 44. Lamb A & Chen LF. The many roads traveled by *Helicobacter pylori* to NFκB activation. *Gut Microbes*. 2010;1:109-113. doi:10.4161/gmic.1.2.11587
- 45. Sepulveda AR, Yao Y et al. CpG methylation and reduced expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2010;138:1836-1844. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.042
- 46. Raju D, Hussey S et al. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1160-1171. doi:10.1053/j.gastro.2012.01.043
- 47. Tegtmeyer N, Zabler D et al. Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol*. 2009;11(3):488-505. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01269.x
- 48. Conteduca V, Sansonno D et al. *H. pylori* infection and gastric cancer: State of the art (Review). *Int J Oncol*. 2013;42:5-18. doi:10.3892/ijo.2012.1701
- 49. Sommer F & Backhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):227-238. doi:10.1038/nrmicro2974
- 50. Libânio D, Dinis-Ribeiro M & Pimentel-nunes P. *Helicobacter pylori* and microRNAs: Relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions. *World J Clin Oncol*. 2015;6(5):111-133. doi:10.5306/wjco.v6.i5.111
- 51. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
- 52. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process–First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992;52(24):6735-6740.
- 53. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988;48(13):3554-3560.
- 54. Mejías-Luque R & Gerhard M. Immune Evasion Strategies and Persistence of *Helicobacter pylori*. In: Tegtmeyer N, Backert S, eds. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori*. Cham: Springer International Publishing; 2017:53-71. doi:10.1007/978-3-319-50520-6_3
- 55. Suerbaum S. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol IJMM. 2000;290(2):175-181. doi:10.1016/S1438-4221(00)80087-9
- 56. Battan R, Raviglione MC et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Gastroenterol*. 1990;85:1576-1579.
- 57. Tan S, Tompkins LS & Amieva MR. *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000407.
- 58. Wang YH, Wu JJ & Lei HY. When *Helicobacter pylori* invades and replicates in the cells. *Autophagy*. 2009;5:540-542.
- 59. Terebiznik MR, Vazquez CL et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2006;74:6599-6614. doi:10.1128/IAI.01085-06
- 60. Wang YH, Wu JJ & Lei HY. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. *Exp Biol Med*. 2009;234:171-180. doi:10.3181/0808-RM-252
- 61. Targa-Cadamuro AC, Teixeira-Rossi AF et al. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. 2014;20(6):1424-1437. doi:10.3748/wjg.v20.i6.1424
- 62. Alvarez-Arellano L, Camorlinga-Ponce M et al. Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51:473-479.
- 63. Fehlings M, Drobbe L et al. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun*. 2012;80:2724-2734. doi:10.1128/IAI.00381-12
- 64. Shiotani A, Uedo N et al. Predictive factors for metachronous gastric cancer in high-risk patients after successful *Helicobacter pylori* eradication. *Digestion*. 2008;78:113-119. doi:10.1159/000173719
- 65. Wang J, Xu L et al. Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. *Digestion*. 2011;83:253-260. doi:10.1159/000280318
- 66. Fukase K, Kato M et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372:392-397. doi:10.1016/S0140-6736(08)61159-9
- 67. Perri F, Cotugno R et al. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. Pylori* infected patients and effect of

eradication. Am J Gastroenterol. 2007;102:1361-1371. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01284.x

- 68. Park SY, Yoo EJ et al. Comparison of CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant stages of gastric cancer, stratified for *Helicobacter pylori* infection. *J Pathol*. 2009;219:410-416. doi:10.1002/path.2596
- 69. Chan AO, Peng JZ et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. *Gut.* 2006;55:463-468. doi:10.1136/gut.2005.077776
- 70. Ha M & Kim NV. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Publ Gr. 2014;15(8):509-524. doi:10.1038/nrm3838
- 71. Chiang HR et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* 2010;24:992-1009.
- 72. Kozomara A & Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D68-D73.
- 73. Tabassam FH, Graham DY & Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. *Cell Microbiol*. 2009;11:70-82. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01237.x
- 74. Nagy TA, Frey MR et al. *Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Infect Dis.* 2009;199:641-651. doi:10.1086/596660
- 75. Kim DY, Cha ST et al. STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:646-651. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05671.x
- 76. Belair C, Darfeuille F & Staedel C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:806-812.
- 77. Hayashi Y, Tsujii M et al. CagA mediates epigenetic regulation to attenuate let-7 expression in *Helicobacter pylori*-related carcinogenesis. *Gut*. 2013;62:1536-1546. doi:10.1136/gutjnl-2011-301625
- 78. Matsushima K, Isomoto H et al. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Int J Cancer*. 2011;128:361-370. doi:10.1002/ijc.25348
- 79. Kumar M, Sahu SK et al. MicroRNA let-7 modulates the immune response to Mycobacterium tuberculosis infection via control of A20, an inhibitor of the NF-κB pathway. *Cell Host Microbe*. 2015;17:345-356. doi:10.1016/j.chom.2015.01.007
- 80. Feng Y, Wang L et al. FoxM1 is overexpressed in *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis and is negatively regulated by miR-370. *Mol Cancer Res.* 2013;11:834-844. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0007
- 81. Baud J, Varon C et al. *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PLoS One*. 2013;8:e60315. doi:10.1371/journal.pone.0060315
- 82. Kang DW, Yang ES et al. MicroRNA-320a and microRNA-4496 attenuate *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA)induced cancer-initiating potential and chemoresistance by targeting β-catenin and ATP-binding cassette, subfamily G, member 2. J Pathol. 2017;241(5):614-625. doi:10.1002/path.4866
- 83. Kalani M, Hodjati H et al. CagA-positive and CagA-negative *Helicobacter pylori* strains differentially affect the expression of micro RNAs 21, 92a, 155 and 663 in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017;63(1):34-40. doi:10.14715/cmb/2017.63.1.7
- 84. Yang F, Xu Y et al. NFkappaB/miR-223-3p/ARID1A axis is involved in *Helicobacter pylori* CagA-induced gastric carcinogenesis and progression. *Cell Death Dis.* 2018;9:12. doi:10.1038/s41419-017-0020-9
- 85. Kim K, Lee HC et al. Epigenetic regulation of microRNA-10b and targeting of oncogenic MAPRE1 in gastric cancer. *Epigenetics*. 2011;6:740-751.
- 86. Thorns C, Kuba J et al. Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma. *Virchows Arch.* 2012;460(4):371-377. doi:10.1007/s00428-012-1215-1
- 87. Liu WJ, Xu Q et al. Expression of serum let-7c, let-7i, and let-7f microRNA with its target gene, pepsinogen C, in gastric cancer and precancerous disease. *Tumour Biol.* 2015;36(5):3337-3343. doi:10.1007/s13277-014-2967-9
- 88. Peng W, Liu YN et al. The correlation of circulating pro--angiogenic miRNAs' expressions with disease risk, clinicopathological features, and survival profiles in gastric cancer. *Cancer Med.* 2018;7:3773-3791. doi:10.1002/cam4.1618
- 89. Liang S, He L et al. MicroRNA Let-7f Inhibits Tumor Invasion and Metastasis by Targeting MYH9 in Human Gastric Cancer. *PLoS One*. 2011;6(4):e18409. doi:10.1371/journal.pone.0018409
- 90. Petrocca F, Visone R et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. 2008;13:272-286.
- 91. Valenzuela MA, Canales J et al. *Helicobacter pylori* -induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *W* J G. 2015;21(45):12742-12756. doi:10.3748/wjg.v21.i45.12742
- 92. Li Q, Wang N et al. miR-24-3p Regulates Progression of Gastric Mucosal Lesions and Suppresses Proliferation and Invasiveness of N87 Via. *Dig Dis Sci*. 2016;61(12):3486-3497. doi:10.1007/s10620-016-4309-9
- 93. Fassan M, Saraggi D et al. Let-7c down-regulation in *Helicobacter pylori* -related gastric carcinogenesis. *Oncotarget*. 2015;7(4):4915-4924.
- 94. Xie G, & Li W. *Helicobacter Pylori* Promote B7-H1 Expression by Suppressing miR-152 and miR- 200b in Gastric Cancer Cells. *PLoS One*. 2017;1:1-13. doi:10.1371/journal.pone.0168822
- 95. Bai F, Jiu M et al. miR-29a-3p represses proliferation and metastasis of gastric cancer cells via attenuating HAS3 levels. *Mol Med Rep.* 2018;17(6):8145-8152. doi:10.3892/mmr.2018.8896
- 96. Liu X, Cai J et al. MicroRNA-29a inhibits cell migration and invasion via targeting Roundabout homolog 1 in gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):3944-3950. doi:10.3892/mmr.2015.3817
- 97. Zhang H, Cheng Y et al. MicroRNA-29s could target AKT2 to inhibit gastric cancer cells invasion ability. *Med Oncol*. 2015;32(1):342. doi:10.1007/s12032-014-0342-8
- 98. Zhang H, Bai M et al. Cell-derived microvesicles mediate the delivery of miR-29a/c to suppress angiogenesis in gastric carcinoma. *Cancer Lett.* 2016;375(2):331-339. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.026
- 99. He B, Xiao YF et al. hTERT mediates gastric cancer metastasis partially through the indirect targeting of ITGB1 by microRNA-29a. Nat Publ Gr. 2016;6(21955):1-12. doi:10.1038/srep21955
- 100. Zhao Z, Wang L et al. Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World J* Surg Oncol. 2015;13(101):1-7. doi:10.1186/s12957-015-0513-x
- 101. Datta C, Subuddhi A et al. Genome-wide mRNA-miRNA profiling uncovers a role of the microRNA miR-29b-1-5p/PHLPP1 signalling pathway in *Helicobacter pylori*-driven matrix metalloproteinase production in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2018;11:e12859. doi:10.1111/cmi.12859
- 102. Tang B, Li N et al. Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. *Autophagy*. 2012;8:1045-1057. doi:10.4161/auto.20159

- 103.Yang XJ, Si RH et al. Mir-30d increases intracellular survival of Helicobacter pylori through inhibition of autophagy pathway. World J
Gastroenterol. 2016;22(15):3978-3991. doi:10.3748/wjg.v22.i15.3978
- 104. Zhang J, Kuai X et al. microRNA-32 inhibits the proliferation and invasion of the SGC-7901 gastric cancer cell line in vitro. *Oncol Lett.* 2014;7:270-274. doi:10.3892/ol.2013.1667
- 105. Yan C, Yu J et al. MiR-32 promotes gastric carcinoma tumorigenesis by targeting Kruppel-like factor 4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;467(4):913-920. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.044
- 106. Hu HY et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*. 2009;10:413.
- 107. Yang Y, Li X et al. Involvement of microRNAs-MMPs-E-cadherin in the migration and invasion of gastric cancer cells infected with *Helicobacter pylori. Exp Cell Res.* 2018;367(2):196-204. doi:10.1016/j.yexcr.2018.03.036
- 108. Zhang L, Guo X et al. Upregulated miR-132 in Lgr5(+) gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway. *Mol Carcinog.* 2017;9999:1-13.
- 109.Lim JH, Kim SG et al. Helicobacter pylori Is Associated with miR-133a Expression through Promoter Methylation in Gastric
Carcinogenesis. Gut Liver. 2018;12(1):58-66. doi:https://doi.org/10.5009/gnl17263
- 110. Floch P, Capdevielle C et al. Deregulation of MicroRNAs in Gastric Lymphomagenesis Induced in the d3Tx Mouse Model of *Helicobacter pylori* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:1-11. doi:10.3389/fcimb.2017.00185
- 111. Wang F, Liu J, Zou Y et al. MicroRNA-143-3p, up-regulated in *H. pylori*-positive gastric cancer, suppresses tumor growth, migration and invasion by directly targeting AKT2. *Oncotarget*. 2017;8:28711-28724.
- 112. Sundaravinayagam D, Kim HR et al. miR146a-mediated targeting of FANCM during inflammation compromises genome integrity. *Oncotarget*. 2016;7(29):45976-45994. doi:10.18632/oncotarget
- 113. Santos JC, Brianti MT et al. *Helicobacter pylori* infection modulates the expression of miRNAs associated with DNA mismatch repair pathway. *Mol Carcinog*. 2017;56(4):1372-1379. doi:10.1002/mc.22590
- 114. Koch M, Mollenkopf HJ et al. Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:E1153-E1162. doi:10.1073/pnas.1116125109
- 115. Fassi Fehri L, Koch M et al. *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One*. 2010;5:e9500. doi:10.1371/journal.pone.0009500
- 116. Guo JX, Tao QS et al. miR-181b as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13:2263-2267.
- 117. Zhou Q, Zheng X et al. Smad2/3/4 Pathway Contributes to TGF-β-Induced MiRNA-181b Expression to Promote Gastric Cancer Metastasis by Targeting Timp3. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(2):453-466. doi:10.1159/000445638
- 118. Li LQ, Yang Y et al. MicroRNA-181b inhibits glycolysis in gastric cancer cells via targeting hexokinase 2 gene. *Cancer Biomark*. 2016;17(1):75-81. doi:10.3233/CBM-160619
- 119.Chen L, Yang Q et al. MicroRNA-181b targets cAMP responsive element binding protein 1 in gastric adenocarcinomas. IUBMB Life.2012;64:628-635. doi:10.1002/iub.1030
- 120. Saito M, Okayama H et al. CDX2 is involved in microRNA associated inflammatory carcinogenesis in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2017;14:6184-6190. doi:10.3892/ol.2017.6956
- 121. Cai H, Xu J et al. Integrated miRNA-risk gene-pathway pair network analysis provides prognostic biomarkers for gastric cancer. OncoTargets Ther. 2016;9:2975-2986. doi:10.2147/OTT.S95129
- 122. Zhang X, Peng Y et al. Inhibition of the miR-192/215-Rab11-FIP2 axis suppresses human gastric cancer progression. *Cell Death Dis.* 2018;9(778):1-12. doi:10.1038/s41419-018-0785-5
- 123. Zhang X, Cheng Y et al. SMG-1 inhibition by miR-192/-215 causes epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via activation of Wnt signaling. *Cancer Med.* 2017;7(1):146-156. doi:10.1002/cam4.1237
- 124. Huang D, He X et al. Negative regulation of Bmi-1 by AMPK and implication in cancer progression. *Oncotarget*. 2015;7(5):6188-6200.
- 125. Chen J, Sun D et al. Screening of differential microRNA expression in gastric signet ring cell carcinoma and gastric adenocarcinoma and target gene prediction. *Oncol Lett.* 2015;33:2963-2971. doi:10.3892/or.2015.3935
- 126. Ando T, Yoshida T et al. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*. 2009;124:2367-2374. doi:10.1002/ijc.24219
- 127. Chung JJ, Seok HL et al. Expression of MicroRNA in Host Cells Infected with *Helicobacter pylori. Gut Liver*. 2017;11(3):392-400. doi:https://doi.org/10.5009/gnl16265
- 128. Christoffersen NR, Silahtaroglu A et al. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHX1B. *Rna*. 2007;13:1172–1178.
- 129. Craig VJ, Cogliatti SB et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives *Helicobacter*-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res.* 2011;71(10):3616–3624.
- 130. Shi Y, Chen, Xuan X et al. SNP rs3202538 in 3 ' UTR region of ErbB3 regulated by miR 204 and miR 211 promote gastric cancer development in Chinese population. *Cancer Cell Int.* 2017;17(81):1-10. doi:10.1186/s12935-017-0449-z
- 131. Zhou X, Li L et al. Decreased miR-204 in *H. pylori*-associated gastric cancer promotes cancer cell proliferation and invasion by targeting SOX4. *PLoS One*. 2014;9:e101457. doi:10.1371/journal.pone.0101457
- 132. Xu C, Li ME et al. MicroRNA-205 suppresses the invasion and epithelial-mesenchymal transition of human gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* 2016;13:4767-4773. doi:10.3892/mmr.2016.5118
- 133. Tao Y, Song Y et al. miR-205 regulation of ICT1 has an oncogenic potential via promoting the migration and invasion of gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:191-197. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.147
- 134. Teng G, Dai Y et al. *Helicobacter pylori* induces caudal-type homeobox protein 2 and cyclooxygenase 2 expression by modulating microRNAs in esophageal epithelial cells. *Cancer Sci.* 2018;109:297-307. doi:10.1111/cas.13462
- 135. Pachathundikandi SK & Backert S. *Helicobacter pylori* controls NLRP3 expression by regulating hsa-miR-223-3p and IL-10 in cultured and primary human immune cells. *Innate Immun.* 2018;24(1):11-23. doi:10.1177/1753425917738043
- 136. Ma G, Li Q et al. Prognostic Implications of miR-302a/b/c/d in Human Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2017;23(4):899-905. doi:10.1007/s12253-017-0282-7
- 137. Hibino S, Saito Y et al. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis*. 2014;3:e104. doi:10.1038/oncsis.2014.17
- 138. Chen L, Min L et al. Loss of RACK1 Promotes Metastasis of Gastric Cancer by Inducing a miR-302c/IL8 Signaling Loop. *Mol Cell Pathobiol*. 2015;75(18):3832-3842. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3690
- 139. Li YJ, Dong M et al. MicroRNA-371-5p targets SOX2 in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(22):31993-32005. doi:10.18632/oncotarget.8289
- 140. Zhang X, Li X et al. MicroRNA-373 is upregulated and targets TNFAIP1 in human gastric cancer , contributing to tumorigenesis. Oncol Lett. 2013;6:1427-1434. doi:10.3892/ol.2013.1534

- 141. Zhang H, Ma RR et al. KIF26B, a novel oncogene, promotes proliferation and metastasis by activating the VEGF pathway in gastric cancer. Oncogene. 2017:1-11. doi:10.1038/onc.2017.163
- 142. Zhou C, Li X et al. microRNA-372 maintains oncogene characteristics by targeting TNFAIP1 and affects NF κ B signaling in human gastric carcinoma cells. Int J Oncol. 2013;42:635-642. doi:10.3892/ijo.2012.1737
- Belair C, Baud J et al. Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. 143. Silence, 2011:2(7):1-16.
- 144. Wei B, Sun X et al. Isoproterenol regulates CD44 expression in gastric cancer cells through STAT3/microRNA373 cascade. Biomaterials. 2016;105:89-101. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.040
- 145. Yan Z, Xiong Y et al. Identification of recurrence-related genes by integrating microRNA and gene expression profiling of gastric cancer. Int J Oncol. 2012;41:2166-2174. doi:10.3892/ijo.2012.1637
- 146. Fei B & Wu H. MiR-378 inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by targeting MAPK1 in vitro. Oncol Res. 2012;20(12):557-564. doi:10.3727/096504013X13775486749254
- 147. Zhang J, Shi H et al. An insertion/deletion polymorphism in the interleukin-1A 3'-untranslated region confers risk for gastric cancer. Cancer Biomark. 2016;16(3):359-365. doi:10.3233/CBM-160574
- 148. Deng H, Guo Y et al. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer. Gene. 2913;518(2):351-359. doi:10.1016/j.gene.2012.12.103
- 149. Wang JL, Hu Y et al. Candidate microRNA Biomarkers in Human Gastric Cancer: A Systematic Review and Validation Study. PLoS One. 2013;8(9):e73683. doi:10.1371/journal.pone.0073683
- 150. Diao L WS& SZ. Long noncoding RNA GAPLINC promotes gastric cancer cell proliferation by acting as a molecular sponge of miR-378 to modulate MAPK1 expression. OncoTargets Ther. 2018;11:2797-2804.
- Liu H, Zhu L et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. 151. Cancer Lett. 2012;28:196-203. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.034
- Mirzaei H, Khataminfar S et al. Circulating microRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Gastric 152. Cancer: Current Status and Future Perspectives. Curr Med Chem. 2016;23(36):4135-4150.
- Fan D, Ren B et al. Upregulation of miR-501-5p activates the wnt/ β -catenin signaling pathway and enhances stem cell-like 153. phenotype in gastric cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:177.
- Wang B, Yang H et al. Rs56288038 (C/G) in 3' UTR of IRF-1 Regulated by MiR-502-5p Promotes Gastric Cancer Development. Cell 154. Physiol Biochem. 2016;40:391-399. doi:10.1159/000452554
- Isomoto H, Matsushima K et al. Interweaving microRNAs and proinflammatory cytokines in gastric mucosa with reference to H. 155. pylori infection. J Clin Immunol. 2012;32:290-299. doi:10.1007/s10875-011-9626-3
- Yang F, Bi J et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. FEBS J. 2012;279:3159-156. 3165. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x
- Zou M, Wang F et al. MicroRNA-3178 ameliorates inflammationand gastric carcinogenesis promoted by Helicobacter pylori new 157. toxin, Tip-alpha, by targeting TRAF3. Helicobacter. 2017;22:[Epub ahead of print]. https://doi.org/10.1111/hel.12348.
- Bian Y, Guo J et al. miR-3189-3p Mimics Enhance the Effects of S100A4 siRNA on the Inhibition of Proliferation and Migration of 158. Gastric Cancer Cells by Targeting CFL2. Int J Mol Sci. 2018;19(236):1-16. doi:10.3390/ijms19010236
- Pagliari M, Munari F et al. Helicobacter pylori affects the antigen Presentation activity of Macrophages Modulating the expression 159. of the immune receptor CD300E through miR-4270. Front Immunol. 2017;8:1-12. doi:10.3389/fimmu.2017.01288
- 160. Wang X, Li T et al. The Functional SOCS3 RS115785973 Variant Regulated by MiR-4308 Promotes Gastric Cancer Development in Chinese Population. Cell Physiol Biochem. 2016;38:1796-1802. doi:10.1159/000443118
- 161. Luo Y, Zhang C et al. Bioinformatics identification of potentially involved microRNAs in Tibetan with gastric cancer based on microRNA profiling. Cancer Cell Int. 2015;15(115):1-8. doi:10.1186/s12935-015-0266-1
- 162. Dong L, Deng J et al. Interference with the β -catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile. Tumour Biol. 2015;36(9):6973-6983. doi:10.1007/s13277-015-3415-1
- 163. Papadakos K S, 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. 2013;8(3):229-241.
- Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T & Hatzigeorgiou AG. DIANA-164. miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. Nucleic Acids Res. 2015:gkv403.
- 165. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS IPA (QIAGEN Inc.). https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis.
- Wang B & Xi Y. Challenges for MicroRNA Microarray Data Analysis. Microarrays. 2013;2:34-50. doi:10.3390/microarrays2020034 166.
- Git A, Dvinge H et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies 167. for measuring differential microRNA expression. RNA. 2010;16:991-1006. doi:10.1261/rna.1947110.one
- 168. Kanehisa M, Furumichi M et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res. 2017;45(Database issue):D353-D361. doi:10.1093/nar/gkw1092
- 169.
- Uphoff CC & Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. Curr Protoc Mol Biol. 2014;106(3):13-23.
- Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos L, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, 170. Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T & Hatzigeorgiou AG. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. Nucl Acids Res. 2014.
- 171. Lewis BP, Burge CB & Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005;120(1):15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- 172. Hamoy IG, Darnet S et al. MiRNA Expression Profile for the Human Gastric Antrum Region Using Ultra-Deep Sequencing. PLoS One. 2014;9(3):e92300. doi:10.1371/journal.pone.0092300
- Bonet C, Garcia N et al. Genetic association of gastric cancer with miRNA clusters including the cancer-related genes MIR29, 173. MIR25, MIR93 and MIR106: Results from the EPIC-EURGAST study. Int J Cancer. 2014;135:2065-2076. doi:10.1002/ijc.28850
- 174. Prieto-Garcia E, Diaz-Garcia CV et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in tumor prograssion. Med Oncol. 2017;34(122):1-10. doi:10.1007/s12032-017-0980-8
- 175. Dieckmann KP, Radtke A et al. Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker fer Germ Cell Tumours. Eur Assoc Urol. 2017;71:213-220. doi:10.1016/j.eururo.2016.07.029
- Quan Y, Wang Z et al. Exosome miR-371b-5p promotes proliferation of lung alveolar progenitor type II cells by using PTEN to 176. orchestrate the PI3K/Akt signaling. Stem Cell Res Ther. 2017;8(138):1-14. doi:10.1186/s13287-017-0586-2
- 177. Liu J, Liu F et al. Screening key genes and miRNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing. Tumour Biol. 2017;39(7). doi:10.1177/1010428317714899
- 178. Li Y, Xie J et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- $\lambda 1$. Protein Cell. 2013;4(2):130-141. doi:10.1007/s13238-012-2081-y

- 179. Lin P, Zhu L et al. Prostate cancer cell proliferation is suppressed by microRNA-3160-5p via targeting of F-box and WD repeat domain containing 8. *Oncol Res.* 2018;15:9436-9442. doi:10.3892/ol.2018.8505
- 180. Yasui T, Yanagida T et al. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Sci Adv.* 2017;3:e1701133.
- 181. Duellman T, Warren C & Yang J. Single nucleotide polymorphism-specific regulation of matrix metalloproteinase-9 by multiple miRNAs targeting the coding exon. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(9):5518-5531. doi:10.1093/nar/gku197
- 182. Jeansonne D, DeLuca M et al. Anti-Tumoral Effects of miR-3189-3p in Glioblastoma. *J Biol Chem*. 2015;190(13):8067-8080. doi:10.1074/jbc.M114.633081
- 183. Kehl T, Backes C et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*. 2017;8(63):107167-107175.
- 184. Borrelli N, Denaro M et al. miRNA expression profiling of "noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features" compared with adenomas and infiltrative follicular variants of papillary thyroid carcinomas. *Mod Pathol*. 2017;30(1):39-51. doi:10.1038/modpathol.2016.157
- 185. Cui T, Gray A et al. A novel tumor-promoting role for miR-4516 in glioblastoma. *AACR; Cancer Res.* 2017;77(13 Suppl). doi:10.1158/1538-7445.AM2017-5726
- 186. Li X, Lv Y et al. Role of microRNA-4516 involved autophagy associated with exposure to fine particulate matter. *Oncotarget*. 2016;7(29):45385-45397. doi:10.18632/oncotarget.9978
- 187. Chowdhari S & Saini N. Gene expression profiling reveals the role of RIG1 like receptor signaling in p53 dependent apoptosis induced by PUVA in keratinocytes. *Cell Signal*. 2016;28(1):25-33. doi:10.1016/j.cellsig.2015.10.015
- 188. Chowdhari S, Sardana K & Saini N. miR-4516, a microRNA downregulated in psoriasis inhibits keratinocyte motility by targeting fibronectin/integrin α9 signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(12):3142-3152. doi:10.1016/j.bbadis.2017.08.014
- 189. Li S, Chowdhury R et al. *Tumor Suppressive MiR-148a Is Silenced by CpG Island Hypermethylation in IDH1 Mutant Gliomas.*; 2014. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0234
- 190. Berillo O, Issabekova A et al. Characteristics of binding sites of intergenic , intronic and exonic miRNAs with mRNAs of oncogenes coding intronic miRNAs. *Afr J Biotechnol*. 2013;12(10):1016-1024. doi:10.5897/AJB12.2054

ПАРАРТНМА

Παθολογοανατομικά στάδια γαστρικής εξαλλαγής

[FoxJG&WangTC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*. 2007;117(1):60-69. doi:10.1172/JCI30111]



Atrophic gastritis Dysplasia Cancer

Intestinal metaplasia