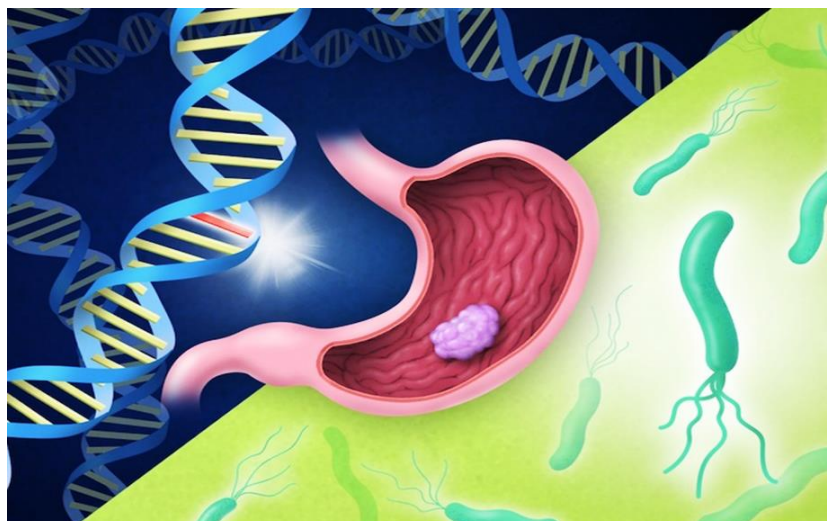


“ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ”

“ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ”

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**“ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΗΣ *H.pylori* και *E.coli* ΣΤΟΥΣ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA”**

**“IMPACT OF *H. pylori* AND *E. coli* COINFECTION ON
DNA REPAIR MECHANISMS”**

Κλαουδάτου Μαρία Γεωργία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**Επιβλέπων**

Διονύσιος Σγούρας,
Διευθυντής Ερευνών,
Εργαστήριο Ιατρικής
Μικροβιολογίας, Ε. Ι. Παστέρ

Συνεπιβλέπων

Αντώνιος Γιακουντής,
Επίκουρος καθηγητής
Μοριακής Βιολογίας και
Γονιδιωματικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

3^ο Μέλος

Νικόλαος Μπαλατσός,
Επίκουρος καθηγητής
Βιοχημείας Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη του Δρ. Σγούρα Διονύσιου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σγούρα για την εμπιστοσύνη που έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέλος του εργαστηρίου και να συμμετάσχω στο επιστημονικό του έργο. Η καθοδήγηση και υποστήριξή του ήταν πολύτιμες καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Παρομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω, για τη συμμετοχή και καθοδήγηση τους, τον κύριο Γιακουντή Αντώνιο, συνεπιβλέποντα της πτυχιακής, και τον κύριο Μπαλατσό Νικόλαο, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής. Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, την κ. Beatriz Martinez-Gonzalez, τον κ. Καραγιάννη Ιωάννη, Μουστάκα Νικόλαο, Ξενάκη Στέλλα και Νάνου Ιωάννα, οι οποίοι με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της πτυχιακής, με την καθοδήγηση και την εμπειρία που μου προσέφεραν, αλλά και με την αμέριστη στήριξη τους τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου οι οποίοι με υποστηρίζουν και βρίσκονται πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη – Abstract	6
A. Εισαγωγή	8
1. <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.1 Γενικά στοιχεία	8
1.2 Λοίμωξη και Παθολογία	8
1.3 Κλινική εικόνα και Επ συσχετιζόμενες ασθένειες.....	10
2. <i>Escherichia coli</i>	12
2.1 Γενικά στοιχεία	12
2.2 Παθογένεια.....	12
2.3 <i>E. coli</i> και Μικροβίωμα.....	12
3. Καρκίνος	13
3.1 Γαστρικός Καρκίνος.....	14
3.1.2 Μοριακή Κατηγοριοποίηση Γαστρικού καρκίνου.....	15
4. Γενωμική Αστάθεια και Μηχανισμοί επιδιόρθωσης.....	16
4.1 Βλάβες στο DNA και Μηχανισμοί επιδιόρθωσής τους	17
5. <i>Helicobacter pylori</i> και καρκίνος	21
6. Αλληλεπιδράσεις του Μικροβιώματος.....	23
7. Σκοπός της εργασίας	24
B. Υλικά και Μέθοδοι	25
1. Υλικά και Μεθοδολογία ευκαρυωτικών κυττάρων.....	25
1.1 Κυτταρικές Σειρές.....	25
1.2 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	25
1.3 Χειρισμός κυττάρων	26
2. Υλικά και Μεθοδολογία Βακτηρίων	29
2.1 Βακτηριακά στελέχη.....	29
2.2 Βακτηριακές καλλιέργειες και χειρισμός	29
3. Πειραματική μεθοδολογία in vitro λοίμωξης και συλλοίμωξης	31
3.1 Πρωτόκολλο της λοίμωξης:	31
3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	32

3.3 Πρωτόκολλο <i>in vitro</i> συλλοίμωξης:	32
4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης στα κυτταρολύματα	33
5. Ανοσοστύπωμα κατά Western:	33
6. Image J	36
Γ. Αποτελέσματα	37
1. Λοίμωξη Επ σε κύτταρα AGS	38
2. Λοίμωξη Επ σε κύτταρα GES-1.....	42
Δ. Συζήτηση	50
Βιβλιογραφία	55
Παράρτημα	60

Περίληψη – Abstract

Το *Helicobacter pylori* αποικίζει περίπου το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού και είναι το πρώτο βακτήριο που αναγνωρίστηκε ως δυνητικά καρκινογόνος παράγοντας. Η χρόνια λοίμωξη με ελικοβακτήριο του πυλωρού οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις του στομάχου συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου. Ειδικότερα το βακτήριο επιμολύνει το γαστρικό επιθήλιο και επάγει ένα σύνολο συνθηκών οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη χρόνιας γαστρίτιδας, γαστρικού έλκους, εντερικής μεταπλασίας και αδενοκαρκινώματος.

Το ελικοβακτήριο επιστρατεύει πολλαπλούς μηχανισμούς για εξασφαλίζει τις συνθήκες που ευνοούν την καρκινογένεση. Αν και οι ακριβείς τρόποι δράσης δεν είναι ξεκάθαροι, έχει δειχθεί η ικανότητα του να επάγει κυτταρικό στρες, βλάβες στο DNA ενώ καταφέρνει να απορρυθμίσει οδούς μεταγωγής σήματος και μόρια συνδεδεμένα με την απόπτωση και την διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στον ρόλο που φαίνεται να παίζει το μικροβίωμα και η σύσταση του στην γαστρεντερική ευεξία. Οι συνθήκες βακτηριακής συμβίωσης ή δυσβίωσης που δημιουργούνται κατά τη συλλοίμωξη 2 ή περισσότερων βακτηρίων μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ικανότητα ενός παθογόνου να επιμολύνει τα κύτταρα του ξενιστή. Είναι γνωστό ότι το ελικοβακτήριο έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει και να απορρυθμίζει την έκφραση μορίων απαραίτητων για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

Δεδομένης της πολυπλοκότητας των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα διαφορετικά είδη και στελέχη του μικροβιώματος, σε αυτή την εργασία έγινε μια προσπάθεια κατανόησης των επιπτώσεων της συλλοίμωξης του *H. pylori* και του *E. coli* στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα GES-1, σε ορισμένες χρονικές στιγμές μετά τη λοίμωξη. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των μορίων FEN 1, APE 1, POLD 1 και γH2AX, για καμία από τις συνθήκες που μελετήθηκαν, όμως παρατηρήθηκαν τάσεις διακύμανσης των επιπέδων έκφρασης τόσο για συλλοίμωξη όσο και για χρόνο-εξαρτώμενη απόκριση στην λοίμωξη με Επ.

Helicobacter pylori colonizes approximately 50% of the world's population and it was the first bacterium to be identified as a carcinogen. Chronic infection with this bacterium leads to pathological conditions, including gastric cancer. Specifically, *H. pylori* infects the gastric epithelium where it induces a set of conditions that can eventually lead to the development of chronic gastritis, gastric ulcer, intestinal metaplasia and adenocarcinoma.

Helicobacter pylori employs multiple mechanisms to ensure the conditions that favor carcinogenesis. Although the exact models of action are not clear yet, its ability to induce cellular stress, DNA damage and deregulation of signaling pathways and genes related to apoptosis and maintaining genome integrity, has been demonstrated. In recent years, studies have focused their interest to the microbiome composition and the key role it plays in gastrointestinal well-being. Events of bacterial symbiosis and/or dysbiosis of two or more bacteria could play a major role in a pathogen's ability to infect host cells. It is known that *H. pylori* has the ability to affect and dysregulate the expression of molecules necessary for the DNA repair pathway.

Considering the complexity of these interactions within the microbiome, consisting of countless different bacterial species and strains, in this project an attempt was made to understand the effects of *H. pylori* and *E. coli* coinfection on the DDR mechanisms in GES-1 cells at specific timepoints post infection. The results did not show statistically significant changes in the expression of the molecules FEN 1, APE 1, POLD 1 and γ H2AX for any of the conditions studied. However, a tendency for variations in expression levels of the aforementioned factors were observed both for the coinfecting cells, and in the *H. pylori* infected in a time-dependent manner.

Α. Εισαγωγή

1. *Helicobacter pylori*

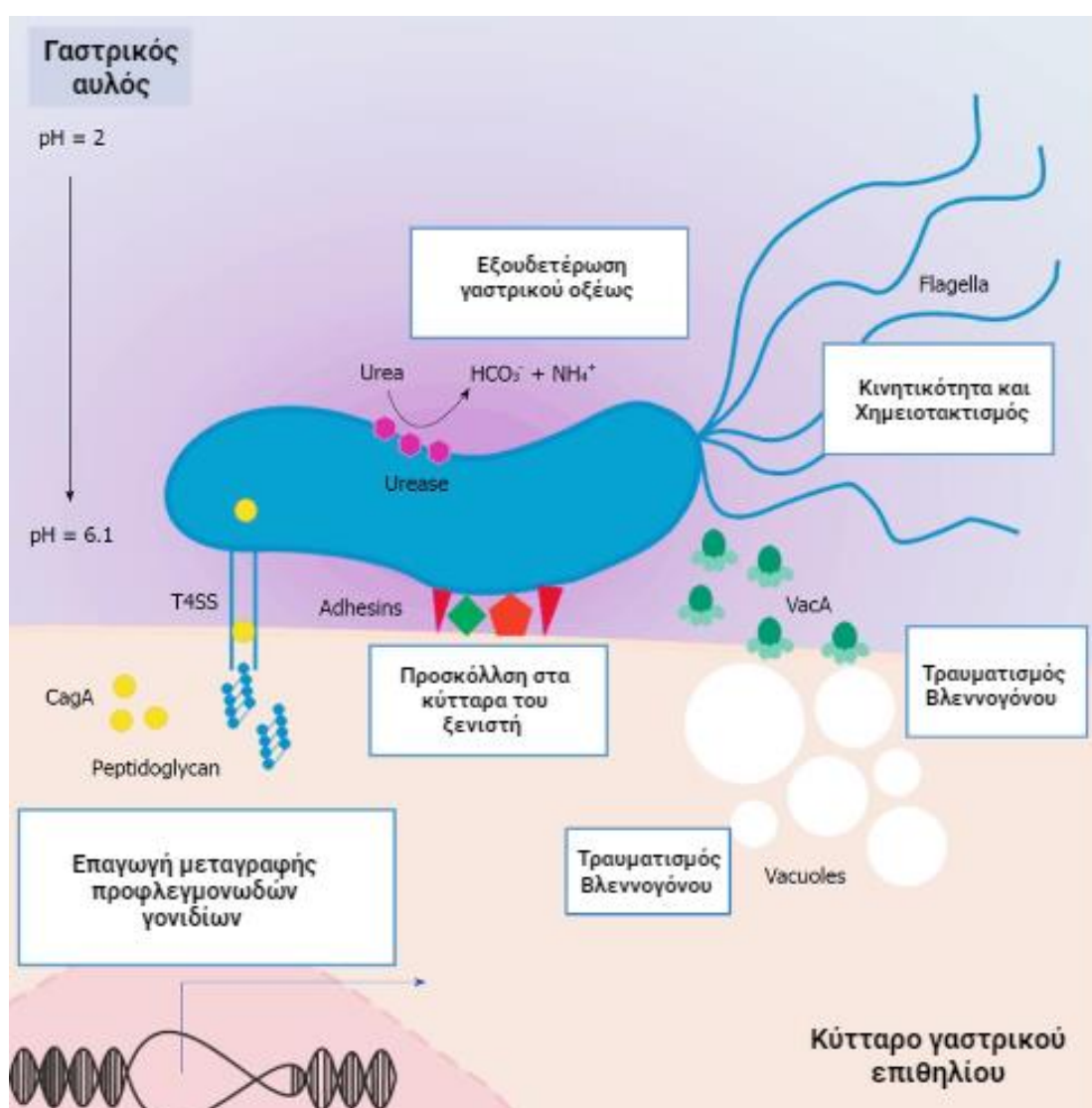
1.1 Γενικά στοιχεία

Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (Επ) είναι ένα παθογόνο βακτήριο το οποίο αποικίζει το γαστρικό επιθήλιο περίπου στο 50% του παγκόσμιου πληθυσμού¹. Ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε πρώτη φορά το 1983 από τους Marshall και Warren από γαστρικές βιοψίες ασθενών ². Είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο, σπειροειδούς μορφολογίας του οποίου η παρουσία στο στομάχι έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη, χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας, πεπτικού έλκους, και MALT λεμφώματος και πλέον αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου.³ Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος αποικίζεται από το Επ για τουλάχιστον 50.000 χρόνια, η μακροχρόνια αυτή σχέση είναι απόρροια της συνεξέλιξης των δύο ειδών, γεγονός που μαρτυράει η σύγκριση των γενετικών τους προφίλ και η ποικιλομορφία που εμφανίζει το Επ σε φορείς ανά τον κόσμο. Η πρωτολοίμωξη επιτυγχάνεται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και, εάν δεν εκριζωθεί, παραμένει εφ' όρου ζωής.⁴

1.2 Λοίμωξη και Παθολογία

Στο στομάχι του ξενιστή η επιτυχής Επ λοίμωξη εξασφαλίζεται αφ' ενός χάρη στην ικανότητα του βακτηρίου να κινείται εντός της βλέννης που καλύπτει το γαστρικό επιθήλιο, μέσω μία κίνησης δίκην κοχλία, που εξασφαλίζεται από την λειτουργία των μαστιγίων του, αφ' ετέρου δε στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και στα μόρια που διαθέτει για την προσκόλληση του στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.⁵ Το Επ με την έκκριση ουρεάσης επιτυγχάνει χημειοτακτισμό και εξουδετέρωση του pH, που ευνοούν την προσέγγιση των επιθηλιακών κύτταρων του στομάχου και την πρόσδεση σε αυτά μέσω βακτηριακών προσκολλητινών (bacterial adhesins). Στη συνέχεια, το βακτήριο, είτε μέσω ενός εκκριτικού συστήματος τύπου-4 (T4SS), ⁶ είτε ανεξάρτητα από αυτό, έχει την ικανότητα να απελευθερώνει πληθώρα λοιμοτοξικών παραγόντων, όπως π.χ. την πρωτεΐνη CagA, λιποπολυσακχαρίτες, DNA, πρωτεολυτικά ένζυμα και άλλους παράγοντες όπως η πρωτεΐνη VacA, τροποποιώντας καθοριστικά ενδοκυττάριας οδούς μεταγωγής σήματος καθοριστικούς για την ομοιοστασία και λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων.⁶

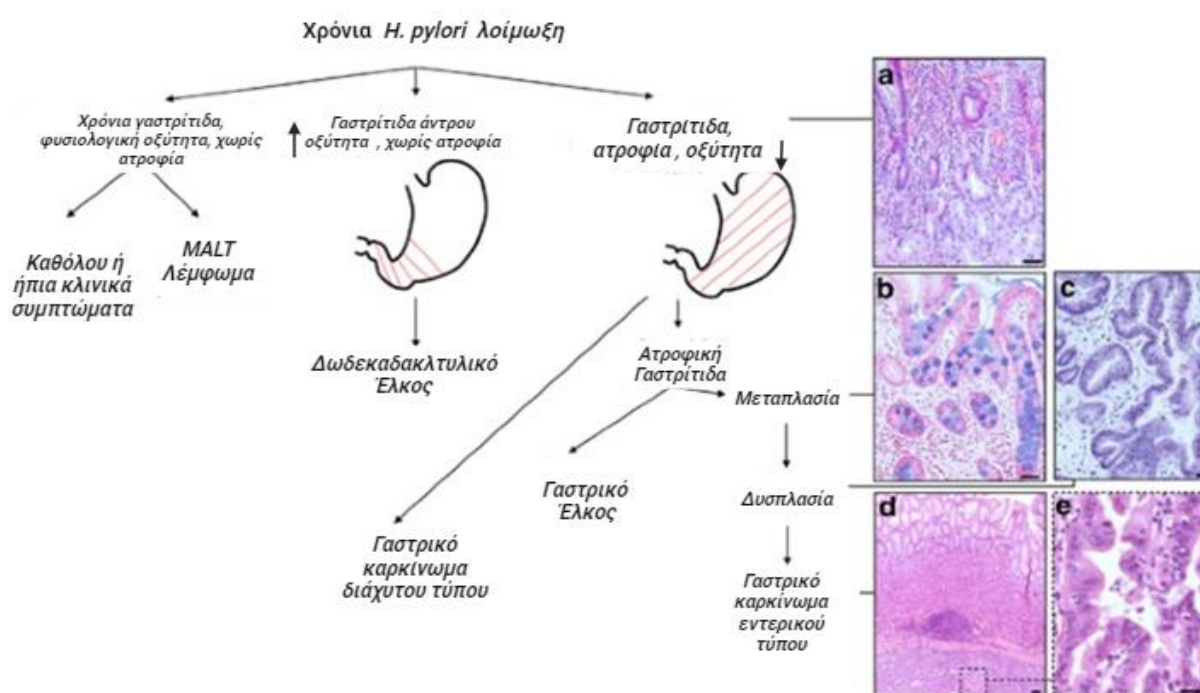
Η χρόνια λοίμωξη με Επ έχει συσχετιστεί ισχυρά με συγκεκριμένες παθήσεις του στομάχου, όπως το πεπτικό και δωδεκαδακτυλικό έλκος και αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. Το *H. pylori* προσκολλάται και επιμολύνει κυρίως τα βλεννοπαραγωγά και οξυπαραγωγά κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου, ενώ τα χαμηλά επίπεδα οξέος που εκκρίνουν ευνοούν τον αποικισμό, κυρίως στην επιφανειακή βλέννα των διακυτταρικών συνδέσμων ⁷ (Εικόνα 1). Η συντριπτική πλειοψηφία των βακτηρίων παραμένουν προσκολλημένα στην επιφάνεια των κυττάρων, όμως έχειδειχθεί ότι ένα μικρό ποσοστό δύναται να εισέρχεται και ενδοκυττάρια, γεγονός που ενδεχομένως μπορεί να επηρεάζει τον μακροχρόνιο χαρακτήρα της λοίμωξης.⁸



Εικόνα 1: Μολυσματικοί λοιμοτοξικοί παράγοντες του *H. pylori* σχετιζόμενοι με την διαδικασία λοίμωξης. Προσαρμοσμένο⁶⁸ (τροποποιημένη)

1.3 Κλινική εικόνα και Επ συσχετιζόμενες ασθένειες

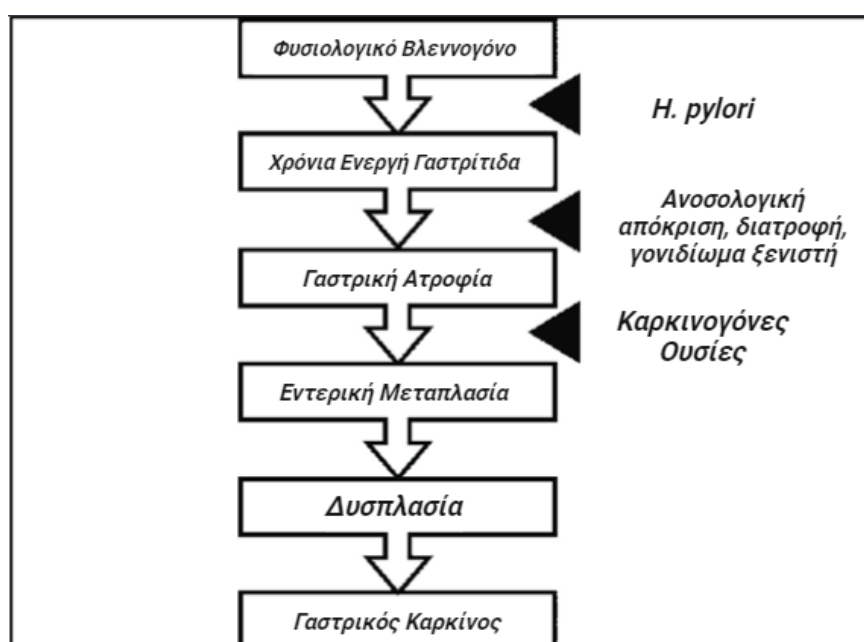
Η παρουσία του Επ στον ξενιστή δεν αποτελεί αυτή καθ' αυτή ασθένεια, αλλά μια συνθήκη που επηρεάζει σημαντικά τις πιθανότητες ανάπτυξης παθήσεων του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα.⁹ Συγκεκριμένα, στη συντριπτική πλειοψηφία των φορέων το Επ επάγει ιστολογικά γαστρική φλεγμονή (γαστρίτιδα), πλην όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό των φορέων εμφανίζουν έντονα κλινικά συμπτώματα. Υπολογίζεται ότι η λοίμωξη συσχετίζεται με την ανάπτυξη πεπτικού έλκους σε ποσοστό 10-15% των φορέων στη διάρκεια της ζωής τους και 1-2% στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου μετά την ηλικία των 60 (**Εικόνα 2**).¹⁰ Οι πιθανότητες ανάπτυξης και η σοβαρότητα αυτών των κλινικών εκφάνσεων της λοίμωξης Επ εξαρτώνται από μία σειρά παραγόντων, που φαίνεται ότι καθορίζονται από το γονιδίωμα του βακτηρίου αναφορικά με την έκφραση συγκεκριμένων λοιμοτοξικών παραγόντων, το γονιδίωμα του ξενιστή σχετικά με γονίδια που ελέγχουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση, καθώς και άλλους παράγοντες που χαρακτηρίζουν διατροφικές (αλάτι) ή άλλες συνήθειες (κάπνισμα) και περιβαλλοντικούς παράγοντες (ατμοσφαιρική μόλυνση).¹¹



Εικόνα 2: Παθογένεια του Επ και ιστοπαθολογική πορεία προς την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. (a) Χρόνια γαστρική ατροφία: χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου. (b) Εντερική Μεταπλασία: Διαφοροποιημένα οξυπαραγωγά (parietal) αντικαθίστανται από κύτταρα με εντερικό φαινότυπο (χρωματισμένα με μπλέ χρωστική). (c) Δυσπλασία του γαστρικού επιθηλίου (d) Διήθηση αδενοκαρκινώματος. (e) Μεγέθυνση εικόνας d, γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. (τροποποιημένη)⁶³

Η χρόνια φλεγμονή που επάγει η λοίμωξη από Επ μπορεί τελικά να οδηγήσει σε απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του γαστρικού επιθηλίου. Ειδικότερα, η λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει στη σταδιακή καταστροφή των γαστρικών οξυντικών αδενίων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ατροφικής γαστρίτιδας και σε επόμενα στάδια στην αντικατάστασή των συγκεκριμένων κυττάρων, από κύτταρα με εντερικό αντί του γαστρικού φαινοτύπου – δημιουργία εντερικής μεταπλασίας¹² (**Εικόνα 2 (b), Εικόνα 3**).

Η σειρά αλλαγών στην ομοιοστασία και την εν γένει λειτουργία των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη γαστρικών προνεοπλασματικών και δυσπλαστικών αλλοιώσεων στο βλεννογόνο περιεγράφηκαν πρώτη φορά από τον Correa και συν. πριν ακόμα την ανακάλυψη του Επ.¹³ Ο αποικισμός του γαστρικού βλεννογόνου από το Επ αρχικά επάγει ανοσολογική απόκριση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί οξεία γαστρική φλεγμονή, δηλαδή διήθηση στο χόριο μονοπύρηνων Th1 λεμφοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων που αποτελεί και το σήμα κατατεθέν της λοίμωξης σε ιστολογικό επίπεδο, στόχος των οποίων είναι η εξουδετέρωση του εισβολέα. Καθώς το Επ δεν φαίνεται να έχει ενδοκυττάρια δράση, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού αδυνατούν να το απομακρύνουν και αντ' αυτού προκαλούν φθορά και αλλοιώσεις στα κύτταρα του επιθήλιου. Η κατάσταση αυτή φαίνεται ότι μπορεί να αποκτά μία χρονιότητα με την εγκατάσταση του Επ και να παρατηρούνται οι σταδιακές αλλοιώσεις που περιέγραψε ο Correa με τελικό στάδιο την καρκινογένεση (**Εικόνα 3**).⁹



Εικόνα 3: Πρότυπη αναπαράσταση του ρόλου του *H. pylori* και άλλων παραγόντων στη γαστρική καρκινογένεση, βάσει του καταρράκτη συμβάντων, τον οποίο πρότειναν οι Correa et al. Προσαρμοσμένο από (τροποποιημένη)²²

2. *Escherichia coli*

2.1 Γενικά στοιχεία

Το *Escherichia coli* είναι ένας gram-αρνητικός, προαιρετικά αναερόβιος βάκιλος, ραβδοειδούς σχήματος, που αποτελεί μέρος του φυσιολογικού εντερικού μικροβιώματος, αποικίζει δε το ανθρώπινο στομάχι λίγες ώρες μετά τη γέννηση.¹⁴ Είναι ένας επιτυχημένος ανταγωνιστής στο πολυπληθές γαστρικό μικροβίωμα καθώς αποτελεί το πιο άφθονο προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Η συμβίωση αυτή είναι αμφίδρομα ωφέλιμη για βακτήριο και ξενιστή και συναντάται εδώ και δεκαετίες.¹⁵ Το *E. coli* είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα μοντέλα προκαρυωτικού οργανισμού.

2.2 Παθογένεια

Ενώ η πλειοψηφία των στελεχών *E. coli* δεν έχει παθογόνο δράση, υπάρχουν και στελέχη που αποτελούν απειλή για τον άνθρωπο. Τα παθογόνα στελέχη απελευθερώνουν μολυσματικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες για τη δράση των οποίων δεν έχουμε πλήρη εικόνα. Έχειδειχθεί ότι αυτά τα στελέχη επηρεάζουν μεγάλο εύρος ευκαριωτικών κυτταρικών διεργασιών, όπως η μοριακή σηματοδότηση, η σύνθεση πρωτεϊνών, καθώς και τη λειτουργία κυτταροσκελετού και μιτοχονδρίων.¹⁵ Επιπλέον, η προαιρετικά αναερόβια φύση του *E. coli* πιθανόν προκαλεί μείωση των επιπέδων του O₂ στην γαστρική βλέννα, παραγωγή K₂ και συμπλόκου-B βιταμινών και διατηρούν ένα περιβάλλον ευνοϊκό την εγκατάσταση αναερόβιων βακτηρίων.¹⁴ Αυτές οι συνθήκες δύνανται να λειτουργούν θετικά ή αρνητικά για διαφορετικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι ανταγωνίζονται το *E. coli*.¹⁶

2.3 *E. coli* και Μικροβίωμα

Το εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου αποτελείται από αναρίθμητα βακτηρία και ο συνδυασμός αυτών είναι μοναδικός για κάθε άτομο. Η αλληλεπίδραση που έχουν αυτοί οι μικροοργανισμοί τόσο μεταξύ τους όσο και προς την εντερική φυσιολογία του ξενιστή είναι περίπλοκη και δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Δεδομένου ότι το *E. coli* είναι το πιο διαδεδομένο βακτήριο της γαστρεντερικής χλωρίδας έχει πιθανώς αναπτύξει σύνθετες και πολυπαραγοντικές σχέσεις με το υπόλοιπο μικροβίωμα. Αναφέρεται βιβλιογραφικά ότι οι σχέσεις αυτές έχουν είτε συνεργατικό είτε ανταγωνιστικό χαρακτήρα¹⁷. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την κυριαρχία ενός βακτηρίου εις βάρος ενός άλλου, μπορεί να αφορούν τόσο στη δημιουργία συγκεκριμένων περιβαλλοντικών συνθηκών, όσο και στην

στοχευμένη παρεμβολή και ενίσχυση σηματοδοτικών μονοπατιών των μικροοργανισμών αλλά και του ίδιου του ξενιστή.

3. Καρκίνος

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη αύξηση και ανάπτυξη κυττάρων, υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι της ασθένειας οι οποίοι κατηγοριοποιούνται με βάση τον ιστό που επηρεάζεται. Ο καρκίνος αποτελεί πολυπαραγοντική ασθένεια, με βασικότερη αιτία τις αλλαγές στο γονιδίωμα, συχνά ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του ατόμου με το περιβάλλον του.¹⁸ Η δημιουργία και ανάπτυξη ενός καρκινικού κυττάρου προαπαιτεί την απόκτηση 6 βασικών βιολογικών χαρακτηριστικών, τα οποία περιλαμβάνουν τη διατήρηση πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης, την αποφυγή σημάτων καταστολής της ανάπτυξης, διαφυγή κυτταρικού θανάτου, την αέναη αντιγραφή του γονιδιώματος, την αγγειογένεση, την ανοσοδιαφυγή και τη μετάσταση (**Εικόνα 4**). Η απόκτηση αυτών των χαρακτηριστικών οφείλεται στη γενετική ποικιλομορφία που δημιουργεί η αστάθεια του γονιδιώματος και στη δημιουργία φλεγμονής η οποία ευνοεί πολλές από τις παραπάνω διεργασίες¹⁹.

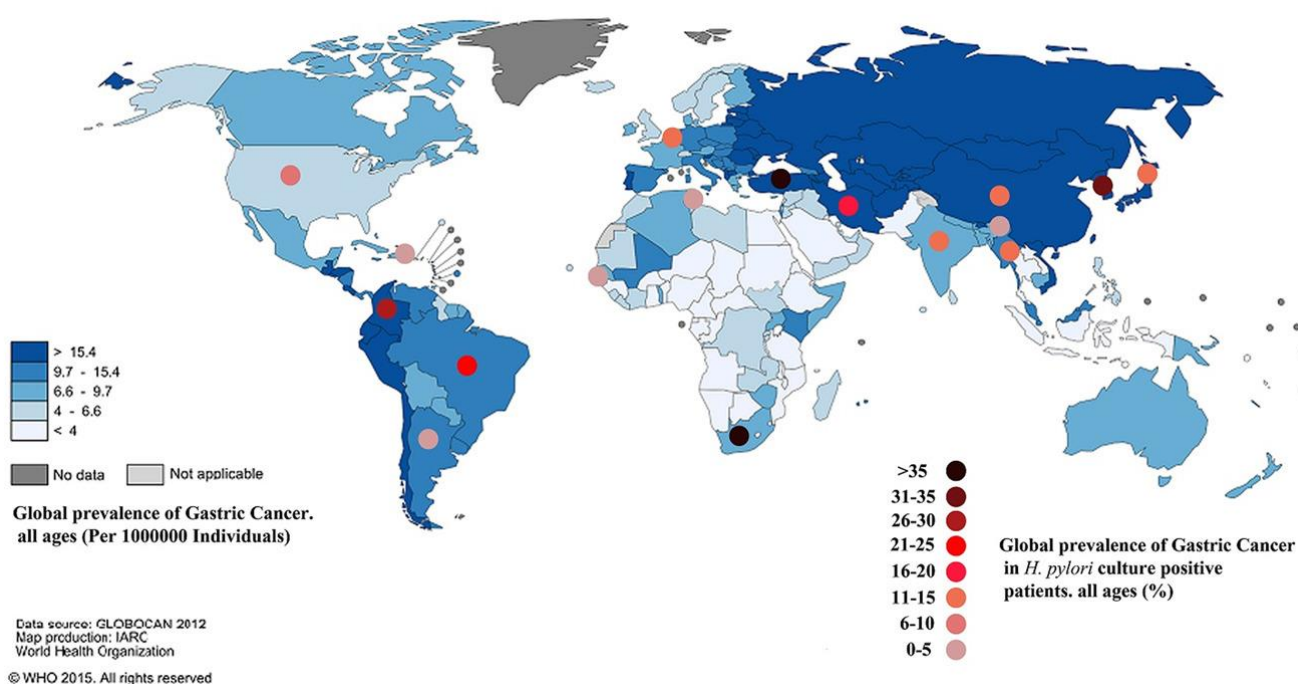


Εικόνα 4 : Χαρακτηριστικά του καρκίνου (τροποποιημένη)⁶⁹

3.1 Γαστρικός Καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος παραμένει ο 5^{ος} συχνότερος τύπος καρκίνου με πάνω από 1,000,000 νέες περιπτώσεις ετησίως.²⁰ Είναι μια ασθένεια της οποίας η εμφάνιση παγκοσμίως συσχετίζεται, εκτός των ανωτέρω αναφερθέντων χαρακτηριστικών και με πληθώρα άλλων παραγόντων, όπως οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες, η διάδοση του δυτικού τρόπου ζωής και οι διατροφικές συνήθειες. Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού θεωρείται ως ο βασικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου, με σχεδόν το 90% των περιπτώσεων αδενοκαρκινώματος μη-καρδιακού τύπου να αποδίδονται στο συγκεκριμένο βακτήριο (Εικόνα 5).²⁰

Το 1994 ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας χαρακτήρισε το *H. pylori* ως τον κύριο παράγοντα κινδύνου που οδηγεί σε καρκινογένεση και γαστρικό καρκίνο.²¹ Το βακτήριο αποικίζοντας το γαστρικό επιθήλιο δημιουργεί συνθήκες φλεγμονής οι οποίες αυξάνουν σημαντικά τις πιθανότητες καρκινογένεσης. Η αλληλουχία του Correa περιγράφει την πορεία αυτή από την φλεγμονή στην ατροφική γαστρίτιδα, τη μεταπλασία και εν τέλει στο αδενοκαρκίνωμα.²²



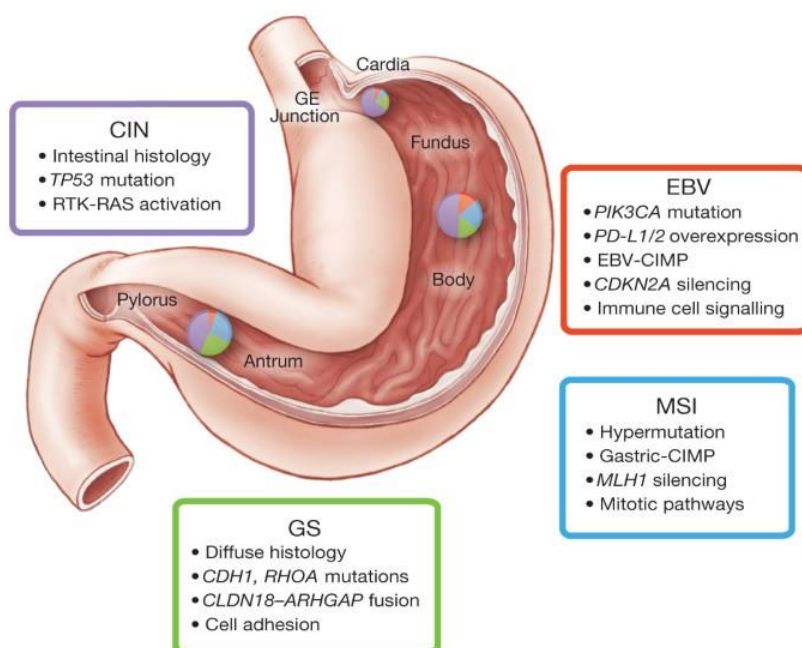
Εικόνα 5: Απεικόνιση του επιπολασμού γαστρικού καρκίνου παγκοσμίως σε συνάρτηση με το *Helicobacter pylori*.⁷⁰

3.1.2 Μοριακή Κατηγοριοποίηση Γαστρικού καρκίνου

Ο Γαστρικός καρκίνος είναι μια ασθένεια που εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και χαρακτηρίζεται από πολλές ιστοπαθολογικές και επιδημιολογικές διαφορές ανά τον κόσμο. Γενετικές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, επιγενετικές τροποποιήσεις και διαφορική έκφραση γονιδίων επηρεάζουν την παθογένεια του καρκίνου του στομάχου. Το 2014 το Cancer Genome Atlas πρότεινε την ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου σε τέσσερις υποκατηγορίες (**Εικόνα 6**), βασισμένη στο γενετικό και μοριακό προφίλ των όγκων. Οι υπότυποι γαστρικού καρκίνου που προέκυψαν είναι οι:

- EBV-θετικοί για ιό Epstein-Barr, οι οποίοι εμφανίζουν επαναλαμβανόμενες PIK3CA μεταλλάξεις καθώς και υπερμεθυλιώσεις του DNA και αυξορύθμιση των JAK2, PD-L1 και PD-L2.
- Οι καρκίνοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-Microsatellite instability), οι οποίοι επιδεικνύουν υψηλά επίπεδα μεταλλαξογένεσης κυρίως σε ογκογονίδια
- Οι γενωμικά σταθεροί καρκίνοι (GS-Genomically stable) οι οποίοι παρουσιάζονται εμπλουτισμένοι στο διάχυτο ιστολογικό τύπο και σε μεταλλάξεις του RHOA ή σε χμιαρκές πρωτεΐνες της οικογένειας των RHO GTPασών

οι καρκίνοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN-Chromosomal instability) οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ανευπλοειδίας και αυξημένων επιπέδων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης.²³

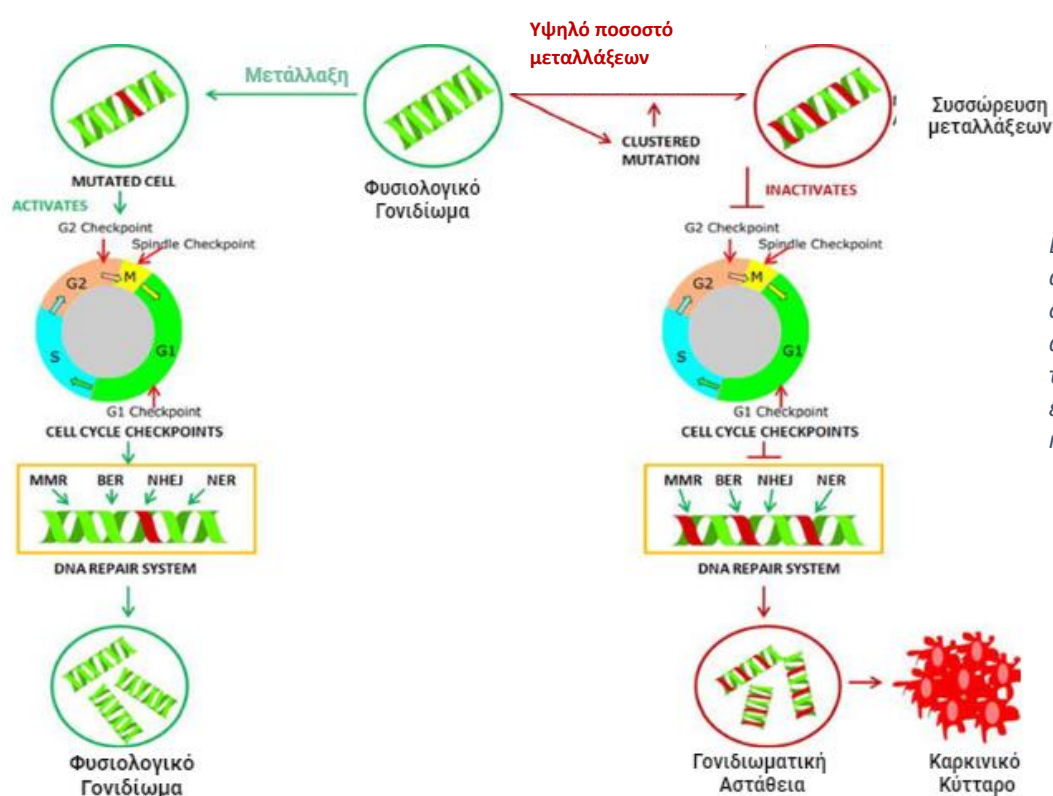


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των υποτύπων του γαστρικού καρκίνου και των βασικών χαρακτηριστικών τους. Η ποσοστιαία κατανομή εμφάνισης των μοριακών υποτύπων στις διακριτές περιοχές του στομάχου απεικονίζεται στα ένθετα διαγράμματα (τροποποιημένη).²³

Μεταξύ αυτών των υποκατηγοριών γαστρικού καρκίνου παρατηρούνται κοινά μοτίβα και χαρακτηριστικά, όπως η αυξημένη έκφραση μορίων εμπλεκόμενων σε σηματοδοτικά μονοπάτια μίτωσης, και σε μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες του DNA. Η διαφοροποιημένη έκφραση και γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αυτές παρατηρήθηκαν σε όλους τους υποτύπους, αλλά σε χαμηλότερο βαθμό στους GS όγκους.²³

4. Γενωμική Αστάθεια και Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα είναι αλλαγές στη αλληλουχία του DNA και συχνά προκύπτουν από λάθη του κυττάρου κατά την αντιγραφή ή επάγονται από εξωγενείς παράγοντες, όπως οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν τη δυνατότητα να απορυθμίσουν την έκφραση γονιδίων, επηρεάζοντας πρωτεϊνικά επίπεδα και κυτταρικούς μηχανισμούς. Με τη συσσώρευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων το κύτταρο αδυνατεί να διατηρήσει την ακεραιότητα του γονιδιώματος του. Προκειμένου το κύτταρο να ελέγχει τις κυτταρικές διεργασίες που δύναται να οδηγήσουν σε μεταλλαξογένεση, επιστρατεύει ένα σύνολο μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA και σημείων ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο²⁴ (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης γενωμικής αστάθειας, βλαβών του DNA, μηχανισμών επιδιόρθωσης και καρκίνου.²⁵

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους το κύτταρο αποτρέπει την συσσώρευση βλαβών στο DNA. Ειδικά μόρια "σαρώνουν" το γονιδίωμα ανιχνεύοντας και επιδιορθώνοντας λάθη στην αλληλουχία του, ενώ αν η επιδιόρθωση είναι αδύνατη το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση.²⁵ Στα φυσιολογικά κύτταρα το γενετικό υλικό προστατεύεται σε κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου, κάθε βήμα ελέγχεται με μεγάλη ακρίβεια για λάθη με πολλαπλές "δικλείδες ασφάλειας". Αντίθετα στα καρκινικά κύτταρα αυτά τα συστήματα ελέγχου υπολειτουργούν.

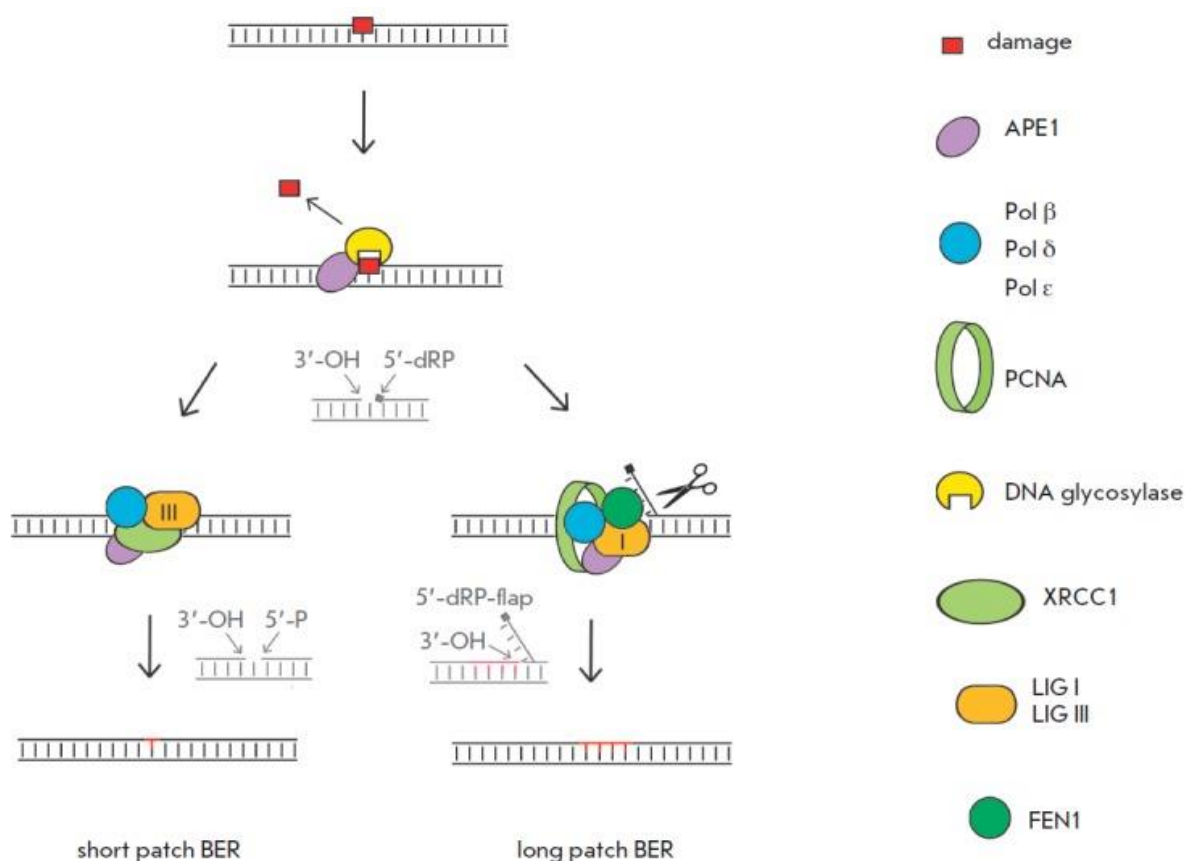
4.1 Βλάβες στο DNA και Μηχανισμοί επιδιόρθωσής τους

Στα ανθρώπινα κύτταρα, βλάβες όπως το λανθασμένο συνταίριασμα νουκλεοτιδικής βάσης ή θραύσεις μονής και διπλής αλυσίδας DNA, επιδιορθώνονται από μηχανισμούς όπως η επιδιόρθωση μέσω Εκτομής βάσης (Base excision repair- BER), μέσω Εκτομής Νουκλεοτιδίου (Nucleotide excision repair- NER), η επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (Mismatch repair- MMR), ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination- HR) και η συνένωση Μη Ομόλογων άκρων (Non Homologous End Joining- NHEJ).²⁵

4.1.2 Επιδιόρθωση μέσω Εκτομής Βάσης BER

Όταν οι βάσεις του DNA έχουν υποστεί αλλοιώσεις λόγω οξειδωσης (ROS), μεθυλίωσης, αλκυλίωσης, απαμίνωσης, υδροξυλίωσης καθώς και οι αβασικές περιοχές στο DNA (AP-sites) επιδιορθώνονται μέσω του μηχανισμού BER, ο οποίος χρησιμοποιείται επιπλέον για τις λανθασμένες αντιστοιχίες βάσεων και για θραύσεις μονής αλυσίδας του DNA (single strand break- SSB)²⁶. Ο μηχανισμός ξεκινάει την επιδιόρθωση με τη δράση μίας DNA-γλυκοζυλάσης (όπως η OGG1) η οποία αναγνωρίζει και αφαιρεί τη λανθασμένη βάση αφήνοντας μια αβασική περιοχή, χωρίς να διασπάσει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του DNA.²⁷ Αφού η γλυκοζυλάση απομακρύνει την επιθυμητή βάση, ένα δεύτερο μόριο, η ενδονουκλεάση APE1 (Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease), ανιχνεύει την αβασική περιοχή και επιτόπου δημιουργεί μια εγκοπή (nick) στην 5' πλευρά της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, που δρα ως υπόστρωμα για την πρόσδεση DNA-πολυμεράσης η οποία, με τη σειρά της, θα εισάγει το σωστό νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία. Μετά το στάδιο της εγκοπής, η επιδιορθωτική διαδικασία μπορεί να ακολουθήσει δύο μονοπάτια, το short-patch (SP) BER, όπου δρα η πολυμεράση POLB εισάγοντας ένα μόνο νουκλεοτίδιο, ή το long-patch (LP) BER κατά το οποίο οι POLD και POLE υποβοηθούμενες από τη PCNA αντικαθιστούν 2-10 νουκλεοτίδια. Η

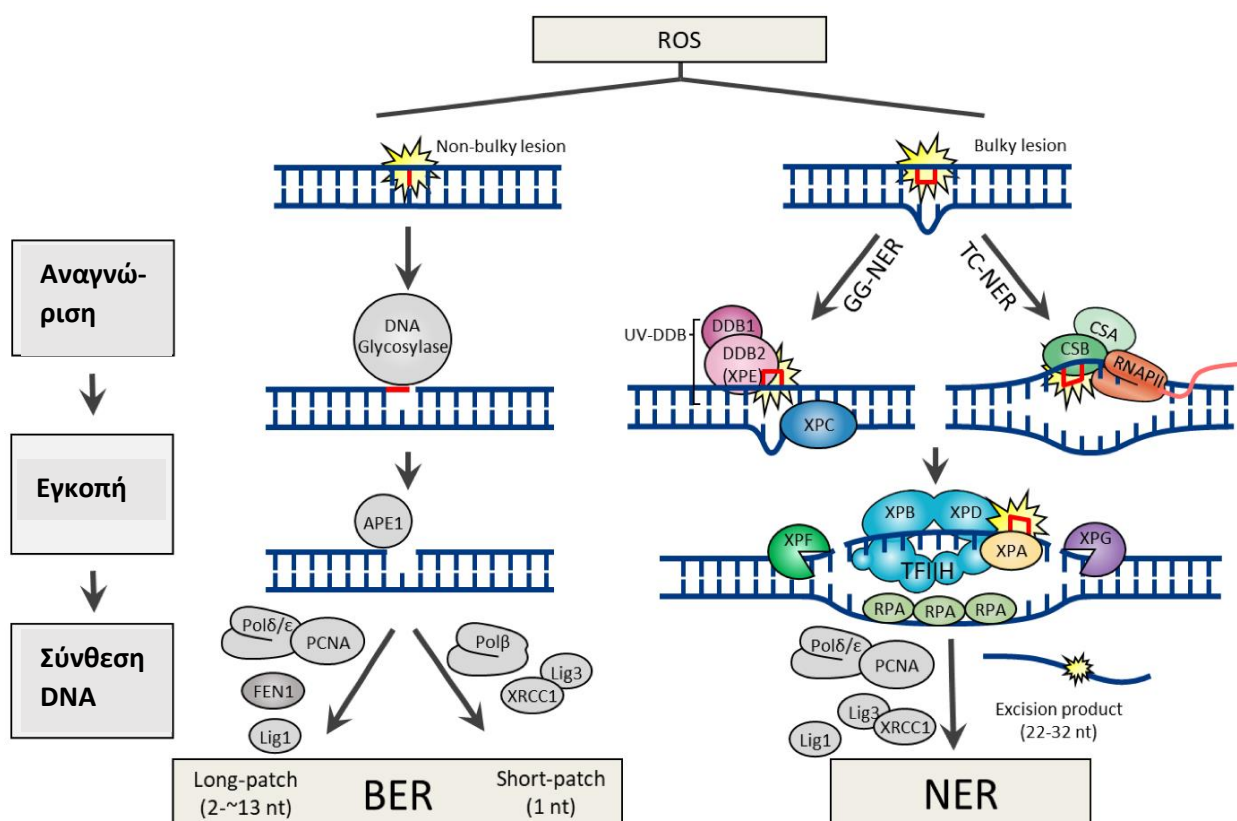
δράση αυτή των PCNA, POLD και POLE εκτοπίζει την ήδη υπάρχουσα αλληλουχία δημιουργώντας ένα προεξέχον τμήμα DNA (flap), το οποίο αφαιρείται από την ενδονουκλεάση FEN1 (flap structure specific endonuclease). Στη συνέχεια, η λιγάση LIG3 υποβοηθούμενη από τον παράγοντα XRCC1 στο SP-BER και η λιγάση LIG1 στο LP-BER σφραγίζουν την εγκοπή με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού και ολοκληρώνουν την επιδιόρθωση (Εικόνα 8).²⁸



Εικόνα 8: Απεικόνιση των μονοπατιών short-patch BER και long-patch BER.²⁹

4.1.3 Επιδιόρθωση μέσω εκτομής Νουκλεοτιδίου NER

Η επιδιόρθωση μέσω εκτομής νουκλεοτιδίου δρα όταν στο DNA προκύψουν τροποποιήσεις και ανακατατάξεις, στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, οι οποίες οδηγούν σε ογκώδεις αλλοιώσεις στη δομή της διπλής έλικας. Τέτοιες αλλοιώσεις στο DNA μπορεί να προκύψουν από UV ακτινοβολία και χημικά μεταλλαξογόνα.³⁰ Οι μεταλλάξεις που δημιουργούνται στην προκειμένη περίπτωση "ενώνουν" πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις της ίδιας αλυσίδας, δημιουργώντας βρόγχους και οι δομές που προκύπτουν εμποδίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA. Σε αντίθεση με τον μηχανισμό BER, στον NER, εντοπίζεται το σημείο επιδιόρθωσης και αφαιρείται τμήμα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (22-32 βάσεων), στα ελεύθερα άκρα που απομένουν εκατέρωθεν των τομών το σύμπλοκο των πολυμερασών POLD και POLE υποβοηθούμενες από τη PCNA, συνθέτουν εκ νέου το τμήμα. Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται από λιγάσες, μια εκ των οποίων είναι και η **LIG1**³¹ (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Απεικόνιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA, μέσω εκτομής βάσης (αριστερά) και μέσω εκτομής νουκλεοτιδίου (δεξιά)²⁸

4.1.4 Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (Mismatch repair - MMR)

Η επιδιόρθωση MMR αφορά κυρίως λάθη στην αλληλουχία του DNA που προκύπτουν κατά την αντιγραφή. Εξειδικευμένα ενζυμικά σύμπλοκα (MutSa και MutSβ) αναγνωρίζουν λανθασμένες αντιστοιχίσεις βάσεων (A-G, T-C) και μικρές προσθήκες ή ελλείματα. Ακολουθεί η στρατολόγηση των συμπλόκων MutL τα οποία δημιουργούν εγκοπή στη θέση της βλάβης και στη συνέχεια, η εξωνουκλεάση EXO1 προσδένεται και αφαιρεί τμήμα της αλυσίδας. Η σωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία συμπληρώνεται εκ νέου και η εγκοπή σφραγίζεται με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού από τα ένζυμα πολυμεράση POLD και LIG1 και τα μόρια που τις υποβοηθούν.³²

4.1.5 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης Θραύσης Δίκλωνου DNA (DSBs)

Οι δίκλωνες θραύσεις στο DNA αποτελούν σπάνιες περιπτώσεις βλάβης, από τις πιο επιβλαβείς για τη γενωμική σταθερότητα και πολύπλοκες ως προς την επιδιόρθωση. Συνήθως προκύπτουν από την κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής του DNA ή από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες όπως είναι οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες (ROS) και η ιονίζουσα ακτινοβολία³³. Τα ανθρώπινα κύτταρα επιστρατεύουν δυο βασικούς μηχανισμούς για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραυσμάτων, την κατευθυνόμενη από Ομολογία επιδιόρθωση με Ανασυνδυασμό και την Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων. Βασικό ρόλο στην επιλογή του μηχανισμού παίζει η φάση του κυτταρικού κύκλου. Πριν την αντιγραφή του γενετικού υλικού (φάσεις G₀-G₁) ευνοείται ο NHEJ και αντίστοιχα κατά τη διάρκεια και μετά την αντιγραφή ο HR (φάσεις S-G₂). Η θραύση και των δυο αλυσίδων, σε αντίθεση με τη μονόκλωνη ρήξη, δεν επιτρέπει στο κύτταρο να χρησιμοποιήσει τη συμπληρωματικότητα των κλώνων του DNA προκειμένου να συνθέσει εκ νέου νουκλεοτιδική αλληλουχία με πρότυπο ανάγνωσης την εναπομένουσα συμπληρωματική και αντιπαράλληλη αλυσίδα.

Ο μηχανισμός NHEJ δεν απαιτεί ομόλογη αλληλουχία, είναι ενεργός καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και επιλέγεται συχνά παρόλο που μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις μέσω γεγονότων ένθεσης ή απαλοιφής νουκλεοτιδίων κατά την επιδιόρθωση. Στο μονοπάτι αυτό αφού ανιχνευτεί η ρήξη, ετεροδιμερή των πρωτεϊνών Ku70 και Ku80 βρίσκουν και προσδένονται στα σπασμένα άκρα του DNA, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο Ku-DNA στο οποίο προσελκύει στη συνέχεια πληθώρα πρωτεϊνικών συμπλοκών τα οποία εν τέλει γεφυρώνουν τα άκρα και το κενό συμπληρώνεται από επεξεργαστικά ένζυμα, την POLλ ή την

POL mu, με την λιγάση LIG IV να δρα τελευταία συνδέοντας με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τα άκρα.^{34 35}

Ο μηχανισμός του ομολόγου ανασυνδυασμού ενεργοποιείται μετά την αντιγραφή του DNA πριν τον χωρισμό των αδελφών χρωματίδων και είναι ιδανικός για την επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων καθώς διασφαλίζει ότι δεν θα υπάρξει απώλεια σημαντικών γενετικών πληροφοριών στο σημείο θραύσης.³⁴ Ο HR εκμεταλλεύεται την παρουσία της αδελφής χρωματίδας και ανιχνεύοντας περιοχή ομολογίας στοιχίζει τις πανομοιότυπες αλληλουχίες, χρησιμοποιώντας την ακέραιη ως πρότυπο για τη σύνθεση της αλληλουχίας επιδιόρθωσης. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι μια περίπλοκη διαδικασία αποτελούμενη από πολλαπλά στάδια με τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνικών συμπλοκών.³⁶

5. *Helicobacter pylori* και καρκίνος

Είναι γνωστό ότι το *H. pylori* προκαλεί χρόνια ατροφική γαστρίτιδα η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εντερική μεταπλασία, δυσπλασία και τελικά γαστρικό καρκίνο.³⁷ Σε αυτή την ακολουθία γεγονότων σημαντικό ρόλο παίζει η χρόνια φλεγμονώδης απόκριση και η δράση λοιμοτοξικών παραγόντων, κυρίως η CagA (cytotoxin- associated gene A) και η VacA (vacuolating cytotoxin A). Οι βακτηριακές αυτές πρωτεΐνες διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στη πρόκληση βλαβών στο DNA του ξενιστή και στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων οδών μεταγωγής σήματος, διαδικασίες που συχνά αλληλοεπιδρούν και αλληλοϋποστηρίζονται. Η λοίμωξη με Επ οδηγεί στη μειωμένη απόδοση των κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Το σύνολο αυτών των γεγονότων αυξάνει την γενωμική αστάθεια, η οποία οδηγεί στην σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων και αυτές με τη σειρά τους απορυθμίζουν ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια με τελικό αποτέλεσμα αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου.³⁸

Τα θετικά για CagA *H. pylori* επικρατούν επιδημιολογικά με ποσοστό 60% στις δυτικές χώρες και 90% στις χώρες της Ασίας.³⁹ Αφού εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μέσω του T4SS, η CagA έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τις κυτταρικές λειτουργίες με τρόπο εξαρτώμενο και μη-εξαρτώμενο της φωσφορυλίωσης της σε κατάλοιπα τυροσίνης που μετέχουν σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα του τύπου γλουταμικό-προλίνη-ισολευκίνη-τυροσίνη-αλανίνη (EPIYA) που εδράζονται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης.⁴⁰ Ειδικότερα, η CagA

επηρεάζει την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ ενέχεται και στη επαγωγή και έκκριση ιντερλευκίνης-8 από τα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου.⁴¹ Μαζί με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά του NF-κβ και της β-κατενίνης,, η CagA ευνοεί συνθήκες καρκινογένεσης μέσω υπερμεθυλίωσης νησίδων CpG ογκοκατασταλτικών γονιδίων καταστέλλοντας τα.^{42,43} Ταυτοχρόνως, έχειδειχθεί ότι ο παράγοντας VacA επάγει κυτταρικό στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυτοφαγία και κυτταρική απόπτωση τα οποία έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη γαστρικής ατροφίας και καρκίνου.³⁸

Είναι γνωστό ότι το *H. pylori* προκαλεί φλεγμονή και ευθύνεται έμμεσα και άμεσα για βλάβες στο DNA του κυττάρου που επιμολύνει. Οι βλάβες αυτές μπορεί να είναι οξειδωτικές τροποποιήσεις των δεοξυνουκλεοτιδίων ή δίκλωνες ρήξεις, απόρροια των ελεύθερων οξειδωτικών ριζών και δραστικών μορφών αζώτου που παράγει το βακτήριο.⁴⁴ Ταυτόχρονα, το Επ φαίνεται να επάγει στα κύτταρα τροποποιήσεις τόσο γονιδιωματικές όσο και επιγονιδιωματικές, με αποτέλεσμα να καταφέρνει να επηρεάσει την λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης σε πολλαπλά στάδια. Πληθώρα ερευνών έχουν δείξει ότι το Επ απορρυθμίζει και παρεμβαίνει στην έκφραση και δραστηριότητα των γονιδίων της επιδιόρθωσης DNA, ενώ παράλληλα διαταράσσει την ικανότητα του κυττάρου να επιλέγει με ακρίβεια τον μηχανισμό που θα δράσει σε κάθε περίπτωση. Το σύνολο αυτών των συνθηκών που δημιουργεί το Επ δύναται να καταλήξει σε καρκινογένεση.³⁸

Ειδικότερα, η λοίμωξη με Επ *in vitro*⁴⁵ και *in vivo*⁴⁶ πειράματα εμφανίζει μειωμένη κυτταρική δραστηριότητα μηχανισμών όπως ο MMR, ο HR και ο BER και μειορρυθμισμό αρκετών από των γονιδίων και πρωτεϊνών τους στη χρόνια λοίμωξη.⁴⁵ Αξίζει να σημειωθεί ότι η εικόνα του μηχανισμού μετά τη λοίμωξη ήταν ανεξάρτητη των λοιμοτοξικών παραγόντων του βακτηρίου. Επιπλέον παρατηρήθηκε από τους Toller et.al μια χρόνο-εξαρτώμενη και δόσο-εξαρτώμενη συσσώρευση DSBs σε κύτταρα γαστρικού επιθηλίου μετά από επώαση με Επ. Αυτές οι δίκλωνες ρήξεις επιδιορθώθηκαν από τα κύτταρα μέσω του NHRJ, του οποίου τα γονίδια εμφάνισαν αυξορρυθμισμό σε αντίθεση με αυτά του HR.⁴⁷

Όσον αφορά άλλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, ιδιαίτερη είναι η εικόνα που εμφανίζει ο BER, καθώς το Επ δείχνει να προκαλεί ανισορροπία ανάμεσα στη δημιουργία και τη επιδιόρθωση αβασικών θέσεων, μειώνοντας την έκφραση της APE1 (ενδονουκλεάσης) αλλά όχι της OGG1 (γλυκοζυλάσης)⁴⁸, ενώ σε πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε ιδιαίτερο μοτίβο απορρυθμισμού της APE 1 με αυξορρυθμισμό σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μειορρυθμισμού στα επίπεδα του μεταγραφήματος της.^{45 46} Αντίθετα, άλλα αποτελέσματα δηλώνουν αύξηση της

APE1 σε κυτταρικές καλλιέργειες και γαστρικές βιοψίες επιμολυσμένες με Επ.⁴⁹ Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το Επ μπορεί να επηρεάζει διαφορετικά τον BER μέσω εναλλακτικών μηχανισμών και μονοπατιών με αντίστοιχα αποτελέσματα για το DNA του ξενιστή.³⁸

Η *H.pylori* λοίμωξη αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση γαστρίτιδας και βασικό παράγοντα κινδύνου για την αύξηση γαστρικού αδενοκαρκινώματος.⁵⁰ Η λοίμωξη μέσω χρόνιας φλεγμονής και απορρύθμισης των βιολογικών διεργασιών προκαλεί μιτογόνα ερεθίσματα, μειωμένη κυτταρική απόπτωση και αυξημένο αριθμό βλαβών στο DNA του ξενιστή.^{51,52} Αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια επικεντρώνονται στην επιρροή που έχει η Επ λοίμωξη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Έχει αναδειχθεί η μειωμένη ικανότητα, των *H.pylori* θετικών γαστρικών κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες που επάγονται στο γονιδίωμα τους.⁵¹ Παρόλα αυτά οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους το βακτήριο απορρυθμίζει αυτές τις λειτουργίες παραμένουν σε μεγάλο ποσοστό άγνωστοι.

6. Αλληλεπιδράσεις του Μικροβιώματος

Το ανθρώπινο γαστρεντερικό μικροβίωμα υπολογίζεται ότι αποτελείται από 10-100 τρισεκατομμύρια συμβιωτικά μικροβιακά κύτταρα με μοναδική σύνθεση για κάθε άτομο. Το σύνολο της μικροβιακής χλωρίδας του ανθρώπου φαίνεται να παίζει καίριο ρόλο στο μεταβολισμό, καθώς και την φυσιολογική και ανοσολογική λειτουργία του ανθρώπινου σώματος.⁵³ Παρόλο που οι μελέτες βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, και οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι, οι ερευνητές έχουν καθορίσει ότι το γαστρικό μικροβίωμα συνδέεται στενά με την ανθρώπινη υγεία και την πιθανότητα ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου.⁵⁴

Η λοίμωξη με Επ φαίνεται να επηρεάζει την σύνθεση, την ποικιλομορφία και τις αλληλεπιδράσεις του γαστρεντερικού μικροβιώματος⁵⁵. Η πλειοψηφία των ερευνών δείχνουν ότι η παρουσία του Επ χωρίς γαστρική ατροφία ή καρκίνο, επιφέρει μείωση στην ποικιλομορφία άλλων ταξινομικών κατηγοριών του γαστρικού μικροβιώματος.⁵⁶ Άλλες έρευνες καταδεικνύουν διαφοροποίηση της μικροβιακής χλωρίδας ανάλογα με την δραστηριότητα της πρωτεΐνης CagA και το στάδιο της Επ λοίμωξης.⁵⁷

Ειδικότερα αναφορικά με την καρκινογένεση υπάρχουν ενδείξεις για αλληλεπίδραση του Επ με non-*H. pylori* βακτήρια του στομάχου και οι συνθήκες βακτηριακής δυσβίωσης που

δημιουργούνται, δύνανται να ευνοήσουν την ανάπτυξη νεοπλασίας μέσω, παραγωγής μεταβολιτών που προάγουν δημιουργία όγκου, καταστροφή του DNA, καταστολή της αντικαρκινικής ανοσίας, και ενεργοποίησης σηματοδοτικών οδών που ευνοούν την ογκογένεση.^{58,59}

7. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός αυτής της πτυχιακής είναι να διερευνηθεί η πιθανή επίπτωση της συλλοίμωξης Επ και *E.coli* στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου είχε καταδείξει ότι η Επ λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μπορεί να επάγει μειορύθμιση σε ένα αριθμό παραγόντων που ενέχονται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, όπως οι DNA γλυκοζυλάσες NTHL1 και MutY, η ενδονουκλεάση FEN1, η ρικομπινάση RAD51, η DNA πολυμεράση POLD1 και η DNA λιγάση LIG1. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αρχικά λοίμωξη επιθηλιακών γαστρικών κυτταρικών σειρών AGS και GES-1 με το *Helicobacter pylori* στέλεχος αναφοράς P12. Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά την λοίμωξη στις 1, 2, 4 και 24 ώρες απομονώθηκε το σύνολο του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων και έγινε προσδιορισμός της έκφρασης με τη χρήση ανοσοστύπωσης κατά Western, των FEN 1, APE1 και POLD1 οι οποίες αποτελούν βασικά μόρια των μηχανισμών επιδιόρθωσης BER, NER, MMR, καθώς και στην επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων (POLD1). Επίσης έγινε προσδιορισμός της γ-φωσφορυλιωμένης ιστόνης, γH2AX, η οποία αποτελεί δείκτη ύπαρξης θραύσεων διπλής αλυσίδας στο γονιδίωμα. Οι εν λόγω προσδιορισμοί έγιναν προκειμένου να παρατηρηθεί στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, με το πέρασμα του χρόνου πως επιδρά η λοίμωξη του Επ στα συγκεκριμένα μόρια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και αν επάγεται από το βακτήριο περαιτέρω βλάβη στο ίδιο το γονιδίωμα.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να μελετηθούν τα ίδια μόρια σε κύτταρα GES-1 σε συνθήκες παρουσίας συλλοίμωξης Επ και *E.coli* για 1 ώρα. Πιο συγκεκριμένα, μετά από αρχική μόλυνση των κυττάρων με Επ για 1, 2, 4 και 24 ώρες ακολουθούσε 1 ώρα συνεπιμόλυνσης με *E.coli*.

B. Υλικά και Μέθοδοι

1. Υλικά και Μεθοδολογία ευκαρυωτικών κυττάρων

1.1 Κυτταρικές Σειρές

Στα πειράματα αυτής της πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν 2 κυτταρικές σειρές:

AGS: Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος, απομονωμένα από γυναίκα-ασθενή 54 ετών. Είναι κύτταρα που προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας (adherent cells) και έχουν χρόνο αναδιπλασιασμού 20- 24 ώρες. (American Type Culture Collection, CRL-1739)

GES-1: Σειρά ανθρώπινων κυττάρων γαστρικού επιθηλίου εμβρυικής προέλευσης, τα οποία είναι αθανатоποιημένα μετά από μετασχηματισμό με λοίμωξη SV40⁶⁰. Πρόκειται επίσης για προσκολλητικά κύτταρα (adherent cells) με χρόνο αναδιπλασιασμού 20- 24 ώρες. (American Type Culture Collection, CVCL_EQ22)

1.2 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco, GlutaMax) με προσθήκη 10% κατ' όγκο FBS (Fetal Bovine Serum inactivated, Εμβρυικός βόειος ορός, Gibco) και 1% κατ' όγκο αντιβιοτικών Πενικιλίνης και Στρεπτομυκίνης, (P/S). Το συνολικό αυτό διάλυμα αποτελεί το πλήρες θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η προετοιμασία των ευκαρυωτικών κυττάρων για λοίμωξη με βακτήριο προϋπέθετε την αντικατάσταση του πλήρους θρεπτικού υλικού σε θρεπτικό RPMI, 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά P/S

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείτο σε πλαστικές φιάλες εμβαδού επιφανείας 75 cm² (Thermo #159934) με πυθμένα κατάλληλο για προσκόλληση των κυττάρων και πόμα με φίλτρο. Αντίστοιχα, για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν και τρυβλία 6 κυψελίδων (6-well, Corning #3516) με παρόμοιες ιδιότητες.

1.3 Χειρισμός κυττάρων

1.3.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting)

Για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης εξασφαλίζονται μέσα σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂. Οι καλλιέργειες φυλάσσονταν σε αυτές τις συνθήκες και ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2 ημέρες) ελεγχόταν η ανάπτυξη τους. Όταν τα κύτταρα είχαν πλέον δημιουργήσει μια πλήρη και συνεχή μονοστιβάδα, καλύπτοντας τον πυθμένα της φιάλης, ακολουθούσε ανακαλλιέργεια τους (split). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείτο προκειμένου να διαιωνιστεί η ανάπτυξη των κυττάρων καθώς όταν βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά συρροής (confluency), η μείωση του θρεπτικού μέσου και του χώρου ανάπτυξης επάγει κυτταρικό στρες και θάνατο.

Για την ανακαλλιέργεια απομακρυνόταν το υπάρχον θρεπτικό μέσο και γινόταν εκπλύση των κυττάρων με 12mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco PBS). Το PBS αφαιρείτο και ακολουθούσε προσθήκη 3mL διαλύματος ενζύμου τρυψίνης 0,25% κατ' όγκο σε PBS. Η καλλιέργεια επωαζόταν σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα, καθώς η δράση του ενζύμου ευνοεί σε αυτές τις συνθήκες. Όταν όλα τα κύτταρα είχαν πλέον αποκολληθεί η δράση της τρυψίνης απενεργοποιούνταν με προσθήκη τριπλάσιου όγκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Από αυτό το εναιώρημα κυττάρων συγκεκριμένος όγκος μεταφερόταν σε νέα φιάλη με νέο θρεπτικό υλικό, στην επιθυμητή αραιώση, σε τελικό όγκο 12 mL. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα του ρυθμού ανάπτυξης της κάθε κυτταρικής σειράς και κάθε ανακαλλιέργεια αντιστοιχούσε στο πέραςμα μιας κυτταρικής γενιάς (cell passage).

1.3.2 Κρυοσυντήρηση και ξεπάγωμα κυττάρων

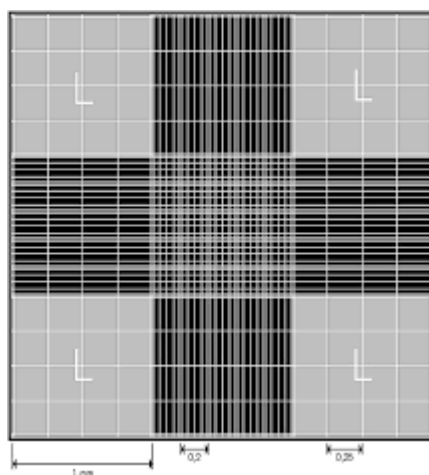
Δείγμα από κάθε κυτταρική σειρά (stock) φυλάσσονταν στο υγρό άζωτο (LN₂) σε θερμοκρασία -180°C, διαδικασία που επιτρέπει την μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων. Η αποθήκευση τους γινόταν σε ειδικό θρεπτικό υλικό που περιέχει 5% κατ' όγκο Διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl Sulfoxide – DMSO), 10% FBS και RPMI. Η διαδικασία της κρυοσυντήρησης ακολουθούσε τα βήματα της ανακαλλιέργειας μέχρι και την τρυψινοποίηση, μετά την απενεργοποίηση της τρυψίνης το εναιώρημα μεταφερόταν σε σωλήνες των 15mL και

ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 5' στις 1500 στροφές στους 4 °C. Μετά την φυγοκέντρωση απομακρυνόταν το υπερκείμενο και γινόταν επαναιώρηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο κρυοσυντήρησης. 1 mL από το εναιώρημα μεταφερόταν σε φιαλίδια κρυοσυντήρησης και τοποθετούνταν στους -80°C μέσα σε ειδικό κουτί με τοιχώματα που εμπεριέχουν ισοπροπανόλη, το οποίο επιτρέπει την σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας προς αποφυγή του κυτταρικού στρες. Μετά από 24 ώρες στους -80°C τα φιαλίδια τοποθετούνταν στο υγρό άζωτο. Όταν χρειάζεται να ανακαλλιεργηθεί ποσότητα κυττάρων που φυλάσσεται σε υγρό άζωτο, το φιαλίδιο με τα κύτταρα πρέπει να ξεπαγώνει γρήγορα και το περιεχόμενο 1mL των κυττάρων να μεταφέρεται σε φλάσκα με 11mL πλήρους θρεπτικού μέσου. Για να αποφευχθούν φαινόμενα μειωμένης βιωσιμότητας των κυττάρων λόγω παρουσίας υπολείμματος DMSO, συνιστάται την επόμενη μέρα η αντικατάσταση του υπάρχοντος θρεπτικού μέσου με φρέσκο.

1.3.3 Καλλιέργεια σε τρυβλίο 6 κυψελίδων και μέτρηση κυττάρων

Τα πειράματα λοίμωξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία 6 κυψελίδων στα οποία είχαν καλλιεργηθεί κύτταρα σε συγκέντρωση περίπου 1×10^6 ανά κυψελίδα (όσο είναι η μέγιστη χωρητικότητα). Ο αριθμός των κυττάρων είναι σημαντικός για να υπολογιστεί το MOI (Multiplicity of Infection), δηλαδή ο αριθμός των μικροβίων που θα αναλογεί ανά κύτταρο κατά τη λοίμωξη αλλά και για να εξασφαλιστεί ότι τα κύτταρα είναι αρκετά σε πλήθος για να επιτευχθεί το πείραμα.

Η μέτρηση των κυττάρων γινόταν με την χρήση αιμοκυτταρόμετρου ή πλάκας Neubauer. Η πλάκα αυτή φέρει ένα πλέγμα με 4 πεδία που επιτρέπουν την καταμέτρηση και ποσοτικοποίηση των κυττάρων μιας καλλιέργειας. Τα βήματα που ακολουθούντο ήταν ίδια με αυτά της ανακαλλιέργειας μέχρι την απενεργοποίηση της τρυψίνης, από το εναιώρημα των κυττάρων 100μL μεταφέρονταν σε φιαλίδιο Eppendorf 1,5 mL. Για να διαπιστωθεί η ζωτικότητα των κυττάρων κατά τη μέτρηση προστίθεται χρωστική Trypan Blue (SIGMA #T8154) σε αναλογία 1/10 κατ' όγκο του εναιωρήματος, καθώς η συγκεκριμένη χρωστική βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα. Σε κάθε πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας της Neubauer μεταφέρονταν 10 μl του διαλύματος κυττάρων με τη χρωστική και γινόταν μέτρηση των κυττάρων ξεχωριστά σε κάθε ένα από τα 4 πεδία (4x4 τετραγωνάκια) στα άκρα του πλέγματος (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Πλέγμα πλάκας *neubauer* όπου όπου με L εμφανίζονται τα 4 πεδία που μετρούνται τα κύτταρα

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση κυττάρων ανά mL, μετά τον υπολογισμό του MO (μέσος όρος) των κυττάρων από το σύνολο των μετρήσεων, πολλαπλασιάζεται ο αριθμός αυτός με τον συντελεστή αραιώσης του δείγματος και το 10^4 σύμφωνα με τις σταθερές της Neubauer.

$$MO \times 1,1 \times 10^4 = \text{κύτταρα/mL}$$

Με γνωστή τη συγκέντρωση των κυττάρων ανά mL, γινόταν αραιώση του εναιωρήματος στην επιθυμητή συγκέντρωση με βάση τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ανά κυψελίδα. Για τελικό αριθμό κυττάρων 1×10^6 τη στιγμή της λοίμωξης στρώνονταν αρχικά σε κάθε κυψελίδα $2,5 \times 10^5$ κύτταρα, έτσι ώστε στο πέραςμα δύο 24ώρων, να έχουν επιτευχθεί 2 αναδιπλασιασμοί και τα προσκολλημένα κύτταρα να περιέλθουν σε διαδικασία μίτωσης.

Δεδομένου ότι κάθε κυψελίδα έχει χωρητικότητα 2 mL και επιθυμούμε τελικό αριθμό κυττάρων $2,5 \times 10^5$ ανά κυψελίδα, η τελική συγκέντρωση εναιωρήματος που θα μεταφερόταν στα τρυβλία ήταν $1,25 \times 10^5$ κύτταρα ανά mL. Οι συνθήκες του πειράματος απαιτούσαν τη χρήση τεσσάρων τέτοιων τρυβλίων.

Δύο μέρες μετά το στρώσιμο των κυττάρων στα τρυβλία, ελεγχόταν σε κάθε κυψελίδα η ανάπτυξη των κυττάρων και το ποσοστό της επιφάνειας που είχε καλύψει η μονοστοιβάδα των κυττάρων.

2. Υλικά και Μεθοδολογία Βακτηρίων

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Στα πειράματα αυτής της πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη βακτηριών:

- *Helicobacter pylori* το στέλεχος αναφοράς P12
- *Escherichia coli* το στέλεχος αναφοράς UTI89

Το Επ και το *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν για πρωτόκολλο λοίμωξης και συλλοίμωξης των κυττάρων.

2.2 Βακτηριακές καλλιέργειες και χειρισμός

2.2.1 Καλλιέργεια *H. pylori*

Γίνεται αρχικά στερεή καλλιέργεια σε μικροβιολογικό τρυβλίο (Petri- Thermo Fisher) διαμέτρου 90mm και πάχους 3 mm, παρουσία στερεού θρεπτικού υλικού με αιματούχο, σοκολατόχρωμο στερεό θρεπτικό υλικό (Chocolate agar, CHA). Το εν λόγω θρεπτικό αποτελείται από Columbia Blood Agar Base περιεκτικότητας 8% w/v (Oxoid, Hampshire, UK), ως εναλλακτική επιλογή του Wilkins-Chalgren agar. Είναι εμπλουτισμένο με 8% v/v απινωδογονωμένο αίμα (Oxoid) και 5% ορό (Biosera, Nuaillé, FR) αλόγου, συστατικά τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη αναερόβιων και μικροαερόφιλων βακτηρίων. Σε κάθε τρυβλίο μεταφέρονταν 100μl βακτηριακού εναιωρήματος από το καταψυγμένο βακτηριακό εναιώρημα σε γλυκερόλη, το οποίο είναι σε υγρή φάση αφού ξεπαγώσει. Στη συνέχεια το εναιώρημα στρωνόταν ομοιόμορφα με γυάλινη πιπέτα Παστέρ, αναδιπλωμένη με τη χρήση λίχνου.

Η μικροαερόφιλη φύση του Επ απαιτεί τη δημιουργία περιβάλλοντος με χαμηλότερα επίπεδα O₂ για τη βέλτιστη ανάπτυξη του. Έτσι τα τρυβλία της καλλιέργειας τοποθετούνταν μέσα σε ειδικό αεροστεγές δοχείο επώασης (Oxoid) μαζί με ειδικούς φακέλους δημιουργίας μικροαερόφιλων συνθηκών, μέσω δέσμευσης του οξυγόνου, GasPack (Thermo). Το δοχείο με τις καλλιέργειες τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης που διατηρεί τη θερμοκρασία σταθερή στους 37 °C. Έπειτα από περίπου 2 ημέρες, η ανάπτυξη του βακτηρίου επέτρεπε την μεταφορά σε υγρή καλλιέργεια με την οποία πραγματοποιούνταν και η λοίμωξη των κυτταρικών σειρών.

Με έναν κρίκο συλλεγόταν βιομάζα και επαναδιαλυόταν σε 5 mL RPMI με 10% FBS. Μετά από ήπια ανάδευση, 500μl του βακτηριακού εναιωρήματος μεταφερόταν σε οπτικό φωτόμετρο για να υπολογιστεί η σκέδαση με μέτρηση σε $\lambda=600\text{nm}$. Η επιθυμητή τιμή σκέδασης του βακτηριακού εναιωρήματος είναι 0,740, καθώς από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έχει προσδιοριστεί ότι αντιστοιχεί σε συγκέντρωση της τάξης 10^9 cfu. Ως τυφλό (blank) διάλυμα χρησιμοποιούταν πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-10% FBS.

Αφού εξασφαλιζόταν η επιθυμητή οπτική πυκνότητα η υγρή καλλιέργεια τοποθετούνταν σε αεροστεγές δοχείο και μετά σε περιστρεφόμενο τροχιακά επωαστήρα στους 37°C στα 200 rpm για 1,5-2 ώρες. Η ανάδευση αυτή γινόταν για να αναζωογονηθεί το βακτήριο και να εξασφαλιστεί βέλτιστη κινητικότητα και μολυσματικότητα.

2.2.2 Καλλιέργεια *E.coli*

Η καλλιέργεια του *E.coli* αρχικά διεξαγόταν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό LB κατά Miller (Lysogeny Broth ή Luria Bertani- 10gr/L τριπτόνη, 10gr/L NaCl, 5gr/L yeast extract). Η καλλιέργεια γινόταν απευθείας από καταψυγμένο βακτηριακό εναιώρημα *E.coli* σε γλυκερόλη. Με χρήση κρικοφόρου στυλεού, ποσότητα από το βακτηριακό εναιωρήματος απλωνόταν στο τρυβλίο (streaking) και τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης στους 37°C , σταθερής θερμοκρασίας και υγρασίας μέχρι την επόμενη ημέρα.

Μια με τρεις μονήρεις αποικίες απομονώνονταν και επαναιωρούνταν σε 3 mL υγρό LB. Η υγρή καλλιέργεια τοποθετούνταν σε περιστρεφόμενο τροχιακό επωαστήρα στους 37°C στα 200 rpm για 18 ώρες. Μετά το πέρας 18-ωρης επώασης, 1 mL από την υγρή καλλιέργεια μεταφερόταν σε 9 mL RPMI-10%FBS (αραίωση 1:10) και γινόταν επώαση στις ίδιες συνθήκες. Μετά από περίπου 2 ώρες ελεγχόταν στο φωτόμετρο η σκέδαση του δείγματος στα 600nm. Η επιθυμητή σκέδαση ήταν $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$ όπου και η βακτηριακή καλλιέργεια βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης και αποτελούταν από περίπου $1,5 \times 10^8$ colony forming units (cfu)/mL. Στη φάση αυτή το δείγμα ήταν έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για επιμόλυνση.

2.2.3 Κρυοσυντήρηση βακτηρίων :

Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση βακτηρίων γίνεται στους -80°C σε φιαλίδιο κρυοσυντήρησης. Για το λόγο αυτό γινόταν αραίωση βιομάζας από στερεή καλλιέργεια βακτηρίων σε 1-1.5 mL

Brain heart infusion broth (BHIB) + 20% γλυκερόλη. Στο φιαλίδιο αναγραφόταν η ημερομηνία δημιουργίας και η ονομασία του στελέχους και στη συνέχεια αποθηκευόταν στους -80°C . Όλοι οι χειρισμοί βακτηριών πραγματοποιήθηκαν μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (LAF) σε άσηπτες συνθήκες.

3. Πειραματική μεθοδολογία in vitro λοίμωξης και συλλοίμωξης

Στα πειράματα της παρούσας πτυχιακής πραγματοποιήθηκαν αρχικά λοιμώξεις με *H. pylori* σε κύτταρα AGS και GES-1 αντίστοιχα και στη συνέχεια συλλοίμωξεις με *H. pylori* και *E. coli* σε κύτταρα GES-1. Μελετήθηκαν συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση των κυττάρων και για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν 4 χρονικές στιγμές για τη μόλυνση, στις 1, 2, 4 και 24 ώρες.

Σε κάθε πειραματική συνθήκη, ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν είχαν μολυνθεί (uninfected cells). Η επιμόλυνση και στις 2 πειραματικές συνθήκες, γινόταν σε κύτταρα καλλιεργημένα σε τρυβλία 6 κυψελίδων. Στρώνονταν συνολικά τέσσερα τέτοια τρυβλία, ένα για κάθε χρονική στιγμή.

3.1 Πρωτόκολλο της λοίμωξης:

Τη 2^η ημέρα μετά το στρώσιμο των κυττάρων στα τρυβλία ελεγχόταν η καλή ανάπτυξη των κυττάρων και πραγματοποιούταν λοίμωξη. Το πρωτόκολλο λοίμωξης συμπεριλαμβάνει αρχικά την προετοιμασία του εναιωρήματος Επ σε σκέδαση_{600nm} = 0,740 και στη συνέχεια την αλλαγή του θρεπτικού μέσου στην κυτταροκαλλιέργεια με RPMI 10% FBS χωρίς αντιβιοτικό.

Αφού ολοκληρωνόταν η διαδικασία προετοιμασίας του Επ, γινόταν έλεγχος στο μικροσκόπιο για την κινητικότητα και τη μορφολογία του, σαν δείκτες ευρωστίας του βακτηρίου. Για τη λοίμωξη των κυττάρων προστίθετο σε τρεις από τις έξι κυψελίδες του τρυβλίου 100μl από το εναιώρημα του Επ, οι υπόλοιπες 3 κυψελίδες αποτελούσαν τα αμόλυντα κύτταρα. Το MOI της λοίμωξης ήταν 100, δηλαδή 100 βακτήρια ανά ευκαρυωτικό κύτταρο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν για 4 πανομοιότυπα τρυβλία (ταυτόχρονη λοίμωξη) τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης. Από τη στιγμή της λοίμωξης ($t=0$) ακολουθούσε απομόνωση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα 1, 2, 4 και 24 ωρών.

3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση πρωτεϊνών από τα δείγματα και η οπτικοποίηση τους μέσω ανοσοστυπώματος κατά Western επιτρέπει την ημιποσοτική σύγκριση της έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε κάθε συνθήκη.

Σε συνέχεια της λοίμωξης και της επώασης ακολουθούσε συλλογή και λύση των κυττάρων για απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης τους στα προκαθορισμένα χρονικά όρια. Αρχικά, τα τρυβλία με τα μολυσμένα κύτταρα τοποθετούνταν στον πάγο και από τα κύτταρα απομακρυνόταν το θεραπευτικό μέσο, ακολουθούσε έκπλυση με κρύο PBS που περιείχε τον αναστολέα φωσφατασών, ορθοβαναδικό νάτριο (Na_3VO_4) σε αναλογία 1:200. Ακολουθούσε προσθήκη 100μl RIPA buffer (Radio Immuno Precipitation Assay buffer) (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS) στο οποίο συμπεριλαμβάνονταν και αναστολείς πρωτεασών (10 μg/mL λευπεπτίνη, 10 μg/mL απροτινίνης, 250 μg/mL Pefabloc SC (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany)). Η επώαση συντελούταν για περίπου 5 λεπτά με ελαφρά ανακίνηση. Στη συνέχεια, με τη χρήση αποκολλητή κυττάρων γινόταν απόξεση της επιφάνειας κάθε κυψελίδας ξεχωριστά ώστε να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα και να συλλεγεί το συνολικό κυτταρόλυμα στο ρυθμιστικό διάλυμα RIPA. Η συλλογή του κυτταρολύματος γινόταν με τη βοήθεια σύριγγας 1mm σε Eppendorf 1,5mL, ανά συνθήκη η οποία διευκόλυνε την περαιτέρω διαλυτοποίηση των κυτταρικών σχηματισμών. Στο τέλος τα διαλύματα φυγοκεντρούνταν στις 13.000xg, στους 4°C, για 20 min, ώστε να απομονωθεί η ολική πρωτεΐνη στο υπερκείμενο, ενώ αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά παραμέναν στο ίζημα.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν για κάθε ένα από τα 4 τρυβλία στις χρονικές στιγμές που αναφερθήκαν.

3.3 Πρωτόκολλο *in vitro* συλλοίμωσης:

Στη συλλοίμωση η διαδικασία για το *H. pylori* είναι η ίδια με την απλή λοίμωξη, με τη διαφορά ότι η επιμόλυνση με Επ γινόταν σε 4 από τα 6 πηγάδια του τρυβλίου. Στις χρονικές στιγμές 1, 2, 4 και 24 ώρες μετά τη λοίμωξη με Επ, πραγματοποιούνταν συλλοίμωση με *E.coli* διάρκειας 1 ώρας. Στα συγκεκριμένα πειραματικά σχήματα χρησιμοποιήθηκαν 3 συνθήκες ανά τρυβλίο:

1. Λοίμωξη με *H. pylori* (1, 2, 4 και 24 ώρες)
2. Συλλοίμωση *H. pylori* (1, 2, 4 και 24 ώρες) και *E. coli* (1 ώρα)
3. Αμόλυντα κύτταρα.

Η επιμόλυνση με *E. coli* γινόταν για 1 ώρα πριν την διαδικασία τερματισμού του πειράματος και της απομόνωσης των πρωτεϊνών. Το MOI για την λοίμωξη με *E. coli* ήταν 1 βακτήριο ανά κύτταρο, το οποίο για να πραγματοποιηθεί προστίθεντο 7μl εναιωρήματος *E. coli* με σκέδαση_{600nm} = 0,5 σε κάθε κυψελίδα συλλοίμωσης.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης στα κυτταρολύματα

Για κάθε δείγμα ολικής πρωτεΐνης που συλλέχθηκε πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών για την προτυποποίηση της διαδικασίας διεξαγωγής της ανοσοσύτωσης κατά Western, με την χρήση του Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί την πρωτεΐνη Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine serum albumin, BSA) για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης διαδοχικών συγκεντρώσεων με βάση την οποία ποσοτικοποιούνται τα δείγματα. Σε ένα τρυβλίο 96 κυψελίδων (Thermo #269620). Οι 2 πρώτες στήλες χρησιμοποιούνται για την δημιουργία διαδοχικών υποδιπλάσιων αραιώσεων της αλβουμίνης, με την αρχική αραιώση της πρωτεΐνης να είναι 1:10. Για κάθε δείγμα που απομονώθηκε από το πείραμα πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη αραιώση 1:40. Επιπλέον σε 2 κυψελίδες εισήχθησαν από 100μl ddH₂O για να χρησιμοποιηθούν ως τυφλό της μέτρησης. Τέλος, σε κάθε κυψελίδα γινόταν προσθήκη 100μl BCA χρωστικής η οποία παρασκευάζεται με βάση τις οδηγίες του kit. Το πιάτο επωαζόταν στους 37 °C για 1,5-2 ώρες και μεταφερόταν για μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο 69-κυψελίδων.

5. Ανοσοσύτωμα κατά Western:

Για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανασοτυπώματος κατά Western. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ειδική ανίχνευση μορίων από αντισώματα και την οπτικοποίηση τους μέσω χημειοφωταύγειας. Κατά την ηλεκτροφόρηση, είναι απαραίτητο όλα τα δείγματα να περιέχουν την ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης. Ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων και το μέγεθος των κυψελίδων του πηκτώματος που χρησιμοποιούνται, φορτώνονταν 10-20 μg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα. Κάθε δείγμα ογκομετρούνταν και αναμιγνυόταν με 5x

Laemmli's sample loading buffer (0.15 M Tris HCl pH 6.8, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1.2% δωδεκυλοθειϊκό νάτριο, 30% γλυκερόλη, 0.04% κυανό της βρωμοφαινόλης) σε τελική συγκέντρωση 1X. Τα δείγματα έβραζαν για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνταν στον πάγο μέχρι το φόρτωμα στο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τα δείγματα φορτώνονταν σε 10% ή 15% πήκτωμα ακρυλαμίδης και ηλεκτροφορούνταν σε SDS – PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis), χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel) και πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) συγκέντρωσης 5% και 10-15%, αντίστοιχα. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 130V για ~1.5 ώρα. **(Εικόνα 11)** Τα πήκτωμα ύστερα εμβαπτιζόνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και αφήνονταν για μισή ώρα στους 4°C. Ταυτόχρονα πραγματοποιούταν η προετοιμασία των μεμβρανών PVDF (polynvinylidene fluoride, Immobilon-P PVDF, #IPVH00010). Με τη χρήση μεθανόλης γινόταν ενεργοποίηση των μεμβράνων, οι οποίες στη συνέχεια αφήνονταν εντός του διαλύματος μεταφοράς για 20' στους 4°C. Ακολουθούσε η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 300mA για 1-1,5 ώρα στους 4°C.

Η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών ελέγχονταν με χρώση Ponceau (Merck 141194). Οι μεμβράνες ξεπλένονταν με TBS-T 0,05% και τοποθετούνταν σε μεθανόλη για 5 λεπτά. Ακολουθούσε το μπλοκάρισμα των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με χρήση διαλύματος 5% άπαχου γάλακτος (Regilait) σε TBS-T 0.05%. Οι μεμβράνες εμβαπτιζόνταν στο διάλυμα για 1 ώρα, υπό ελαφρά ανάδευση. Κατόπιν, οι μεμβράνες επωάζονταν παρουσία του πρωτοταγούς αντισώματος για 14-16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση.

Χρησιμοποιήθηκαν πρωτοταγή αντισώματα ποντικού και κουνελιού τα οποία αραιώνονται σε διάλυμα BSA 5% ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Την επόμενη μέρα ακολουθούσαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με TBS-T 0.1% και επώαση παρουσία του δευτεροταγούς αντισώματος έναντι ποντικού ή κουνελιού σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος, TBS-T 0.1% για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Τα δευτεροταγή αντισώματα είναι συζευγμένα με υπεροξειδάση του αγριοράπανου (horseradish peroxidase-conjugated). Μετά την επώαση η μεμβράνη υπόκειντο σε 3 δεκάλεπτες πλύσεις με TBS-T 0.1%. Τέλος η ανίχνευση του αντισώματος γινόταν με χρήση χημειοφωταύγειας. Οι μεμβράνες επωάζονταν με διάλυμα ECL (Enhanced Chemiluminescence) Buffer (Millipore WBULS0) για 3-4 λεπτά. Η εμφάνιση γινόταν με τη χρήση film (Fujifilm, Super RX-N 18X24) σε συνθήκες σκότους (dark room).

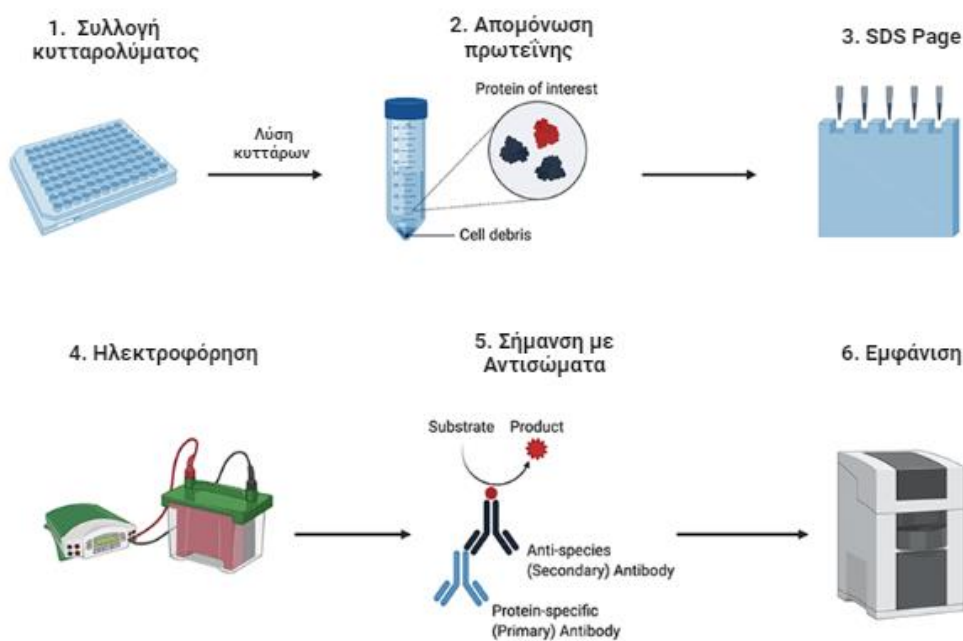
Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις πρωτοταγούς και δευτεροταγούς αντισώματος για κάθε μόριο που μελετήθηκε συνοψίζονται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν με τεχνική western και τα αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν με τις ανάλογες συγκεντρώσεις

Πρωτεΐνη	Αντίσωμα	Συγκέντρωση 1 ^ο αντίσωμα*	Συγκέντρωση 2 ^ο αντίσωμα**	Κωδικός/εταιρεία
FEN 1	a-FEN 1	1:1.500 mouse	1:20.000 a-mouse	#sc_28355
POLD 1	a-POLD 1	1:1.500 mouse	1:20.000 a-mouse	#sc_17776
APE 1	a-APE 1	1:2.000 mouse	1:60.000 a-mouse	#NB100-101
γH2AX	a- γ H2AX	1:1.500 rabbit	1:35.000 a-rabbit	#NB100-384
GAPDH	a-GAPDH	1:6.000 mouse	1:40.000 a-mouse	#sc_47724

* 1st antibody solution → 5% BSA σε TBS-T 0,1% overnight

** 2nd antibody solution → 5% Milk σε TBS-T 0,1% 45 min



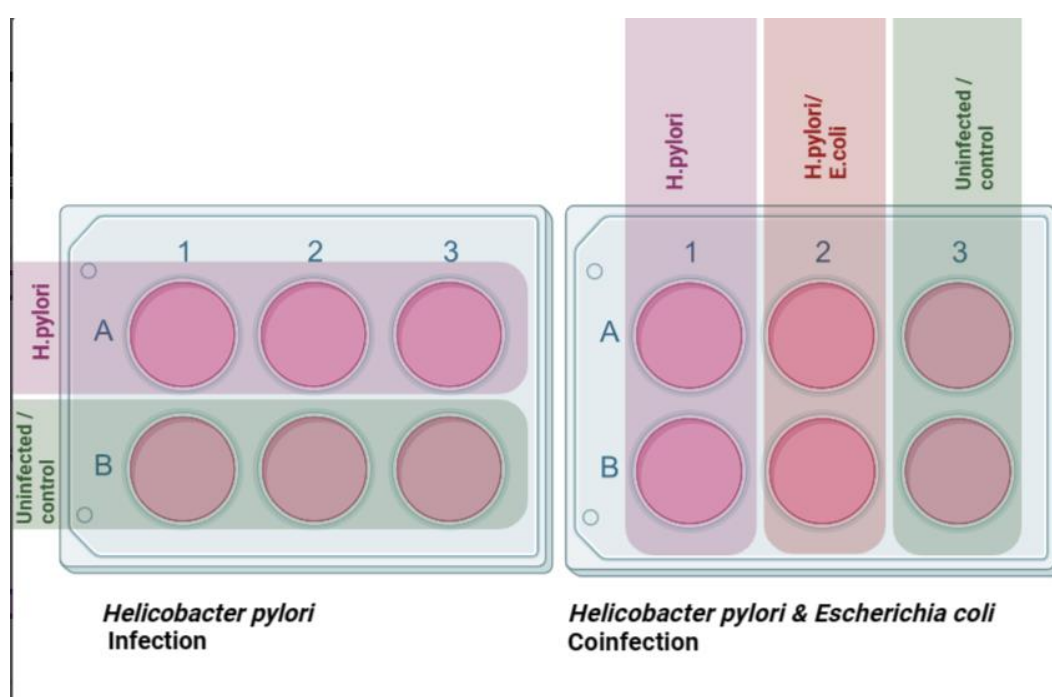
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση ανοστυπώματος κατά Western

6. Image J

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων μέσω οπτικής παρατήρησης των μεμβρανών μιας Western, ειδικά σε περιπτώσεις όπου δεν έχουν φορτωθεί ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων γίνεται χρήση προγραμμάτων τα οποία έχουν δυνατότητες επεξεργασίας των εικόνων και εξαγωγής ακριβών μετρήσεων της έντασης κάθε ζώνης πρωτεΐνης. Αρχικά έγινε επεξεργασία του αρχείου εικόνας ενός film εμφάνισης μέσω της εφαρμογής Image J, με χρήση αντίστοιχων εντολών καθορίστηκαν περιοχές πάνω στην εικόνα οι οποίες θα διαβαστούν από το πρόγραμμα. Όταν όλες οι επιθυμητές περιοχές καθοριστούν, το πρόγραμμα δημιουργεί γραφήματα στα οποία φαίνεται με μορφή καμπυλών η ένταση σήματος κάθε καθορισμένης περιοχής. Με την επιλογή κάθε περιοχής το πρόγραμμα υπολογίζει το εμβαδόν της το οποίο ύστερα εισάγεται σε φύλλα Excel για περαιτέρω ανάλυση. Συλλέχθηκαν μετρήσεις για κάθε γονίδιο ενδιαφέροντος και του αντίστοιχου γονιδίου αναφοράς (GAPDH στη συγκεκριμένη περίπτωση), και ο λόγος που προέκυψε για κάθε δείγμα αποτελεί τη σχετικά επίπεδα της προτεΐνης του γονιδίου που μετρήθηκε. Με αυτό τον τρόπο οι τιμές κανονικοποιήθηκαν και δεν επηρεάστηκαν από τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε, επιτρέποντας τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων. Υπολογίστηκαν μέσοι όροι, τυπικά σφάλματα και τελικά, οι τιμές αυτές οργανώθηκαν σε γραφήματα, με τη χρήση της εφαρμογής Graphpad, με σκοπό να γίνει πιο εύκολη η άμεση σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων.

Γ. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής εργασίας αφορούν πειράματα τριών συνθηκών, λοίμωξη Επ σε AGS κύτταρα, λοίμωξη Επ σε GES-1 κύτταρα και συλλοίμωξη Επ και *E.coli* σε GES-1. Για κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκαν δυο βιολογικές επαναλήψεις. Οι λοιμώξεις στα AGS κύτταρα πραγματοποιήθηκαν τόσο για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για λοίμωξη 24 ωρών, αλλά και για την διερεύνηση σε αρχικές συνθήκες λοίμωξης 1, 2 και 4 ωρών, όσο και για τη σύγκριση με τα αποτελέσματα των κυττάρων GES-1.



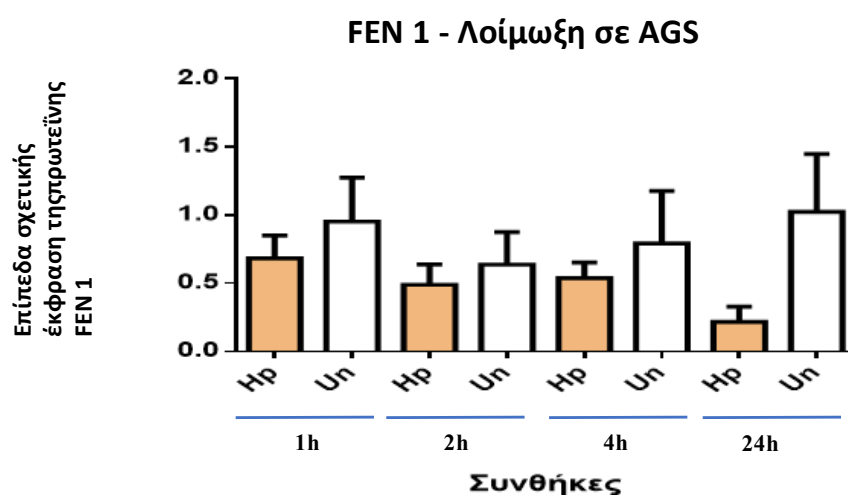
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των συνθηκών των πειραμάτων Λοίμωξης και Συλλοίμωξης των αποτελεσμάτων που αναλύονται στην παρούσα πτυχιακή.

Από το σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών FEN1, APE1, POLD1 και γH2AX, προέκυψαν τα παρακάτω γραφήματα που απεικονίζουν τις διακυμάνσεις της πρωτεϊνικής έκφρασης για κάθε συνθήκη που μελετάται, με τη χρήση του Graphpad. Τα γραφήματα αφορούν τις κανονικοποιημένες τιμές πρωτεϊνικής

έκφρασης με την αντίστοιχη έκφραση του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) που προέκυψαν από ανάλυση του συνόλου των στυπωμάτων, για κάθε μόριο, τα οποία παρατίθενται στο Παράρτημα. Με την χρήση του ίδιου προγράμματος έγινε και έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας της διαφορικής έκφρασης των τιμών με τη μέθοδο t-test και one-way ANOVA. Στατιστική σημαντικότητα θεωρείται ότι υπάρχει στις περιπτώσεις όπου $p\text{-value} \leq 0,05$.

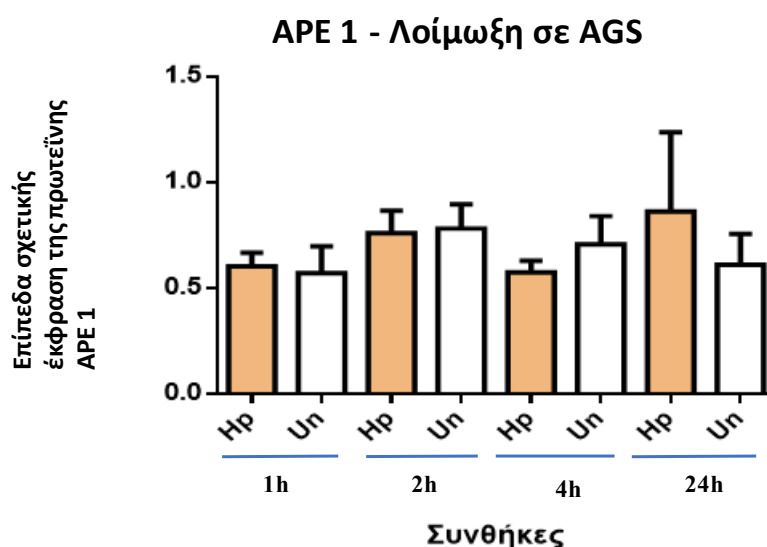
1. Λοίμωξη Επ σε κύτταρα AGS

Όσον αφορά στα πειράματα λοίμωξης AGS με Επ για την ενδονουκλεάση **FEN 1** παρατηρείται τάση μείωσης της σχετικής έκφρασης στα επιμολυσμένα σε σύγκριση με τα αμόλυντα κύτταρα σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από το παρακάτω γράφημα (**Διάγραμμα 1**) στα επιμολυσμένα κύτταρα φαίνεται να υπάρχει μείωση σε σύγκριση με τα αμόλυντα, ενώ μεταξύ των επιμολυσμένων κυττάρων παρατηρήθηκε μια τάση προοδευτικής μείωσης της έκφρασης στα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Η συγκεκριμένη τάση μειορρύθμισης δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



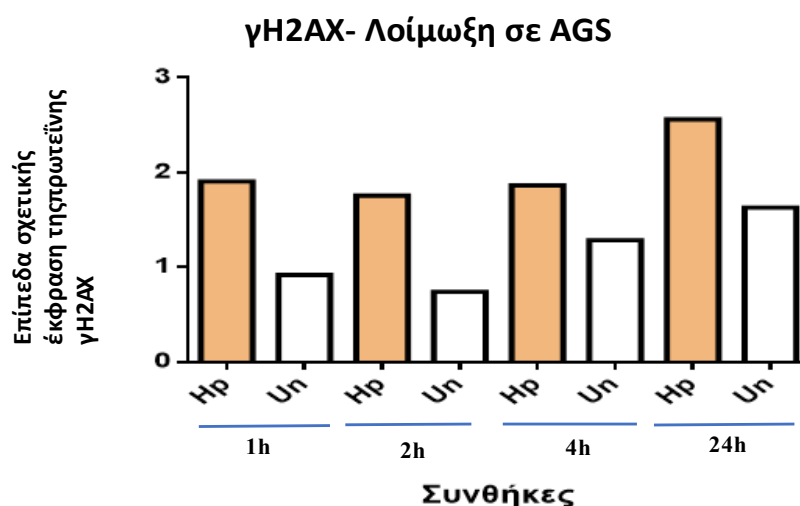
Διάγραμμα 1:
Ιστογράμμο της
σχετικής έκφρασης
του μορίου FEN 1 σε
κύτταρα AGS,
επιμολυσμένα (Hp) με
H. pylori και
αμόλυντα (Un). Το
διάγραμμα
προέκυψε από
ποσοτικοποιήσεις του
συνόλου των
μετρήσεων όλων των
ανοσοστυπωμάτων
κατά Western
(Παράρτημα 1 Α)

Η ενδονουκλεάση **APE 1** στις δυο πρώτες χρονικές στιγμές δεν εμφανίζει κάποια διακύμανση στην έκφραση από τα μολυσμένα στα αμόλυντα κύτταρα, στις 4 ώρες παρατηρείται μια μικρή τάση μείωσης και στις 24 ώρες στα μολυσμένα κύτταρα, η έκφραση του μορίου φαίνεται να αυξάνεται στα επιμολυσμένα κύτταρα (**Διάγραμμα 2**). Αυτή η διαφοροποίηση της έκφρασης στα δείγματα δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



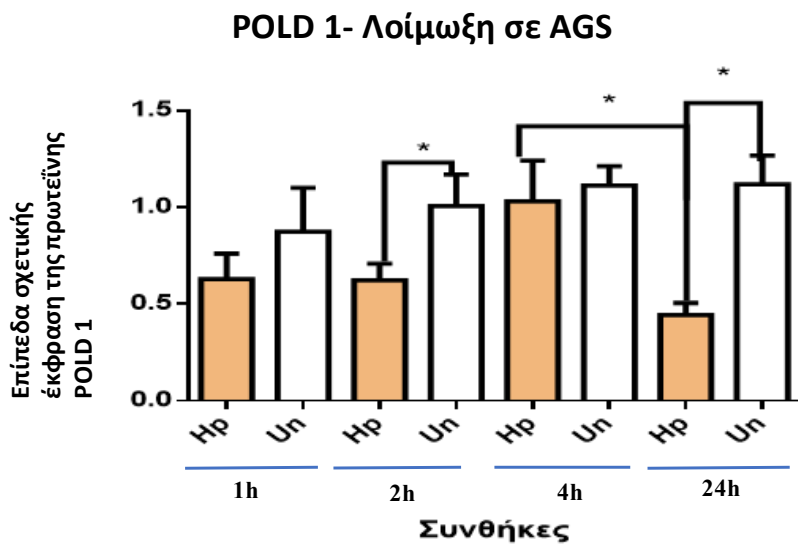
Διάγραμμα 2:
Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου APE 1 σε κύτταρα AGS, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 1 Β)

Όσον αφορά τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη **γH2AX** η έκφραση της φαίνεται να αυξάνεται στα Επ μολυσμένα κύτταρα σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τα αμόλυντα, ενώ παρατηρείται και προοδευτική αύξηση με το πέρασμα του χρόνου της Επ λοίμωξης για τις χρονικές στιγμές του πειράματος (**Διάγραμμα 3**). Η συγκεκριμένη τάση αυξορρύθμισης δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 3: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου γH2AX σε κύτταρα AGS, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 1 Γ)

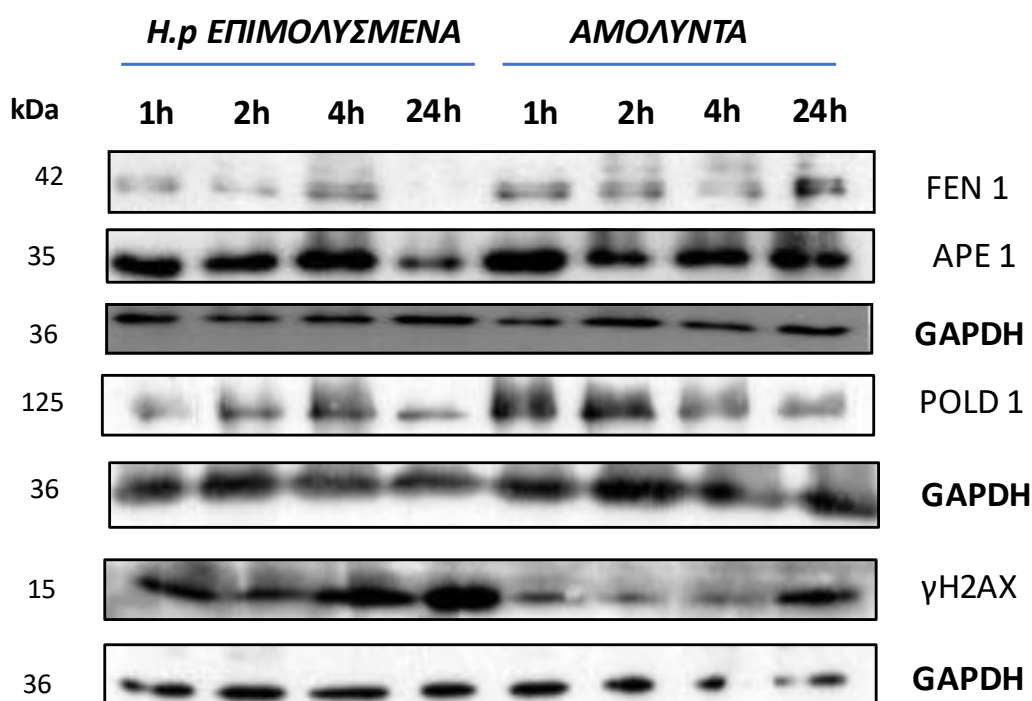
Η πολυμεράση **POLD 1** αντίστοιχα, παρουσιάζει μείωση έκφρασης στα μολυσμένα κύτταρα σε όλες τις χρονικές στιγμές σε σύγκριση με τα αμόλυντα κύτταρα (στατιστικώς σημαντική στις 2 και 24 ώρες), όμως συγκρίνοντας την έκφραση ανάμεσα στη μολυσμένα κύτταρα, στις 4 ώρες μετά τη λοίμωξη παρατηρείται κατακόρυφη αύξηση της πρωτεΐνης η οποία στις 24 ώρες μειώνεται και πάλι (**Διάγραμμα 4**).



Διάγραμμα 4: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου POLD 1 σε κύτταρα AGS, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 1 Δ)

Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων ενδιαφέροντος για τα AGS κύτταρα, όπου φαίνεται η χαρακτηριστική μείωση έκφρασης της ενδονουκλεάσης FEN 1 και αντίστοιχα αποτυπώνονται οριακές τάσεις διαφορική έκφρασης της ενδονουκλεάσης APE 1 και μείωσης της πολυμεράσης POLD 1. Αντίστοιχα, απεικονίζεται η αύξηση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γH2AX για συγκεκριμένες χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν.

AGS Ηρ Λοίμωξη

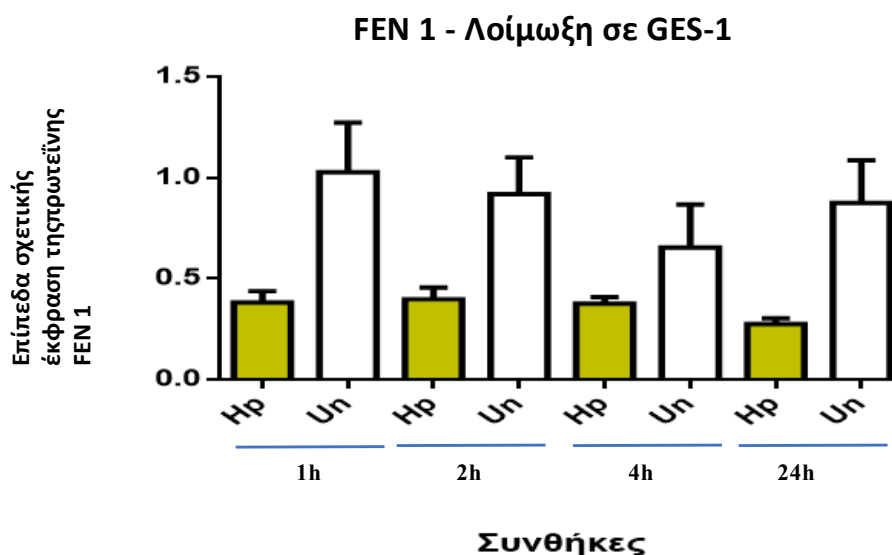


Εικόνα 13: Αντιπροσωπευτικά στυπώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος (FEN 1, APE 1, POLD 1, γH2AX) με το αντίστοιχο στύπωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH) από πειράματα Λοίμωξης με Επ σε κύτταρα AGS

2. Λοίμωξη Επ σε κύτταρα GES-1

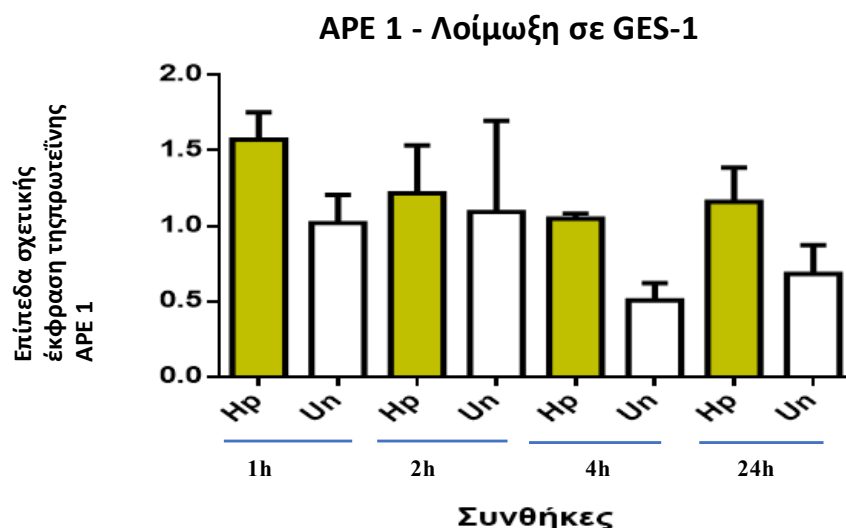
Αντίστοιχα πειράματα λοίμωξης με Επ σε κύτταρα GES-1 έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Η ενδονουκλεάση **FEN 1** στα μολυσμένα GES-1, όπως και στα AGS, φαίνεται να μειώνεται σε σύγκριση με τα αμόλυντα κύτταρα, αλλά και κατά την πάροδο του χρόνου της της λοίμωξης στις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν (**Διάγραμμα 5**). Η συγκεκριμένη τάση μειορρύθμισης δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



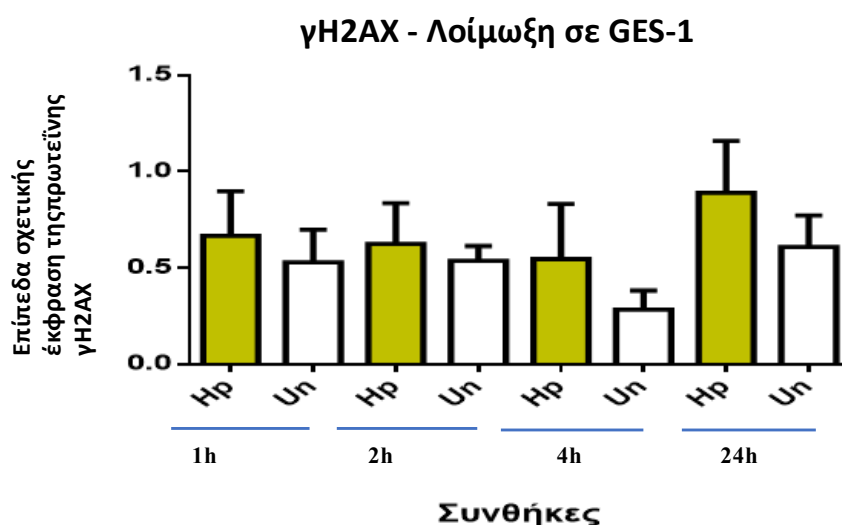
Διάγραμμα 5: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου FEN 1 σε κύτταρα GES-1, επιμολυσμένα (Hp) με *H.pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 2 Α)

Για την ενδονουκλεάση **APE 1** στα GES-1 παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα μολυσμένα κύτταρα συγκριτικά με τα αμόλυντά, όμως όσον αφορά τη λοίμωξη με το πέρασμα του χρόνου από τις 4 στις 24 ώρες παρατηρείται μια μικρή μείωση στην έκφραση (**Διάγραμμα 6**). Αυτή η διαφοροποίηση της έκφρασης στα δείγματα δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



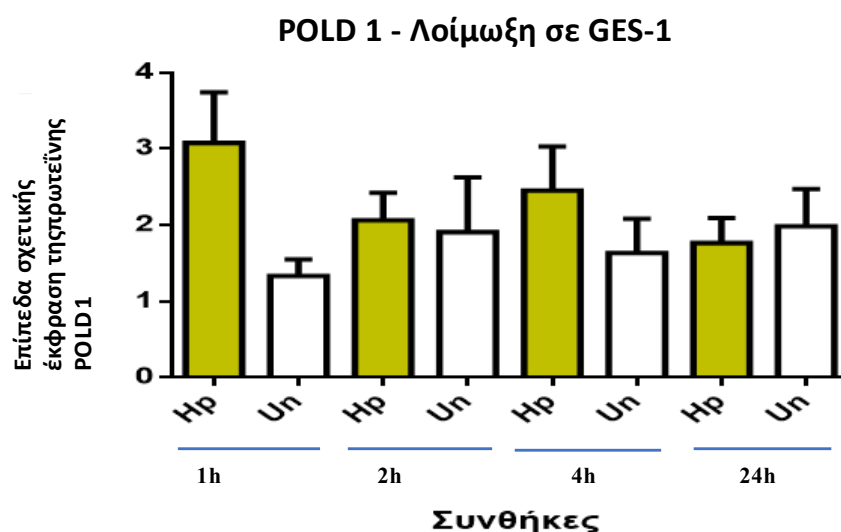
Διάγραμμα 6: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου APE 1 σε κύτταρα GES-1, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 2 Β)

Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη γ H2AX στα GES-1, παρόμοια με τα AGS κύτταρα, φαίνεται να αυξάνεται στη λοίμωξη τόσο σε σύγκριση με τα αμόλυντα κύτταρα, όσο και με το πέρας του ορισμένου χρόνου (Διάγραμμα 7). Ούτε η συγκεκριμένη τάση αυξορρύθμισης αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 7: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου γ H2AX 1 σε κύτταρα GES-1, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 2 Γ)

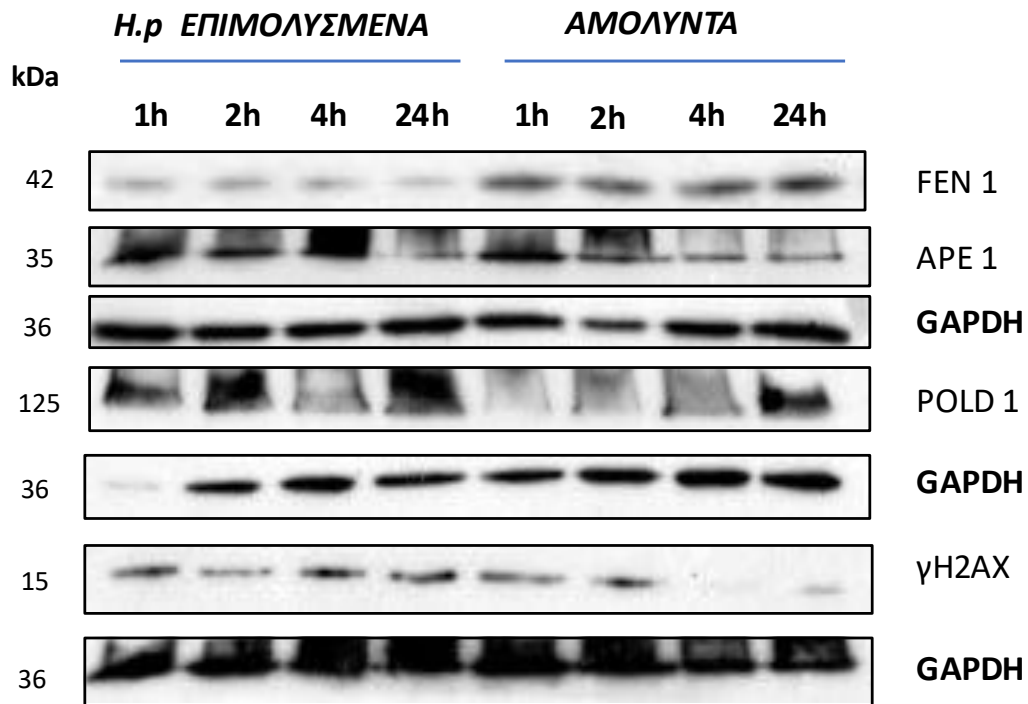
Τέλος για την πολυμεράση **POLD 1**, τα αποτελέσματα σε αυτή την κυτταροσειρά είναι αντίθετα με αυτά που προέκυψαν από τη λοίμωξη σε AGS. Συγκεκριμένα, στα μολυσμένα με Επ κύτταρα τα επίπεδα της πρωτεΐνης φαίνεται να αυξάνονται συγκριτικά με τα αμόλυντα κύτταρα, και παρατηρείται μια μικρή μείωση στις 2 και τις 24 ώρες συγκριτικά με τη 1 και τις 4 ώρες μετά τη λοίμωξη (**Διάγραμμα 8**). Δεν αναδείχθηκε στατιστική σημαντικότητα στις διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν για το σύνολο των επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 8: Ιστόγραμμα της σχετικής έκφρασης του μορίου POLD 1 σε κύτταρα GES-1, επιμολυσμένα (Hp) με *H. pylori* και αμόλυντα (Un). Το διάγραμμα προέκυψε από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοοστυπωμάτων κατά Western (Παράρτημα 2 Δ)

Στην **Εικόνα 14** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων ενδιαφέροντος για τα GES-1 κύτταρα, όπου φαίνεται η χαρακτηριστική μείωση έκφρασης της ενδονουκλεάσης FEN 1 και αντίστοιχη αύξηση έκφρασης της ενδονουκλεάσης APE 1 και αποτυπώνονται οριακές τάσης μείωσης της πολυμεράσης POLD 1 και αντίστοιχης αύξησης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γH2AX για συγκεκριμένες χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν.

GES-1 ΗρΛοίμωξη



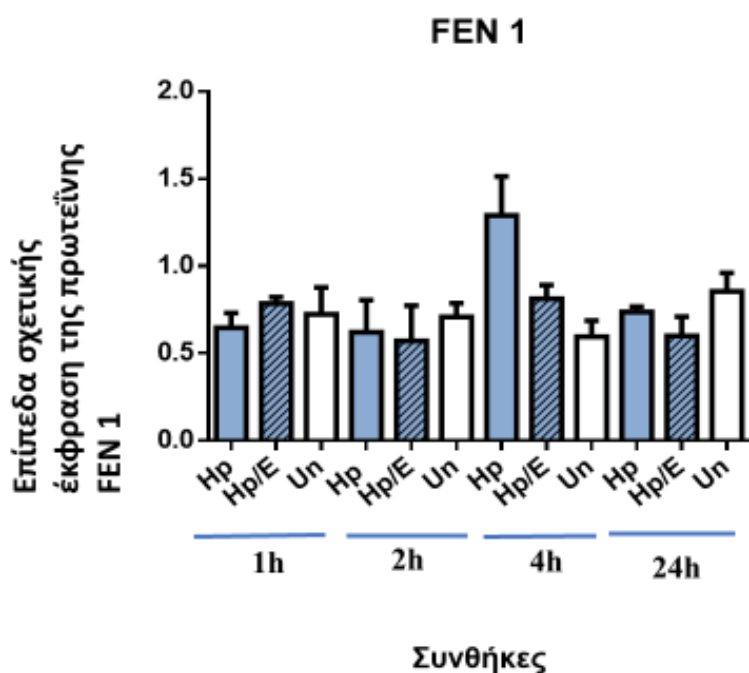
Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικά στυλώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος (FEN 1, APE 1, POLD 1, γH2AX) με το αντίστοιχο στύλωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH) από πειράματα Λοίμωξης με Επ σε κύτταρα GES-1

3. Συλλοίμωξη Επ και *E.coli* σε κύτταρα GES-1

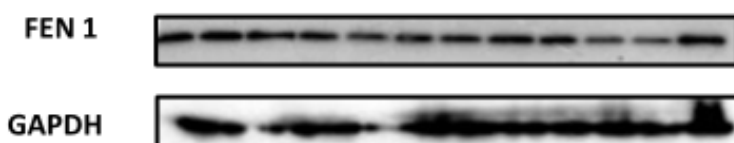
Από τα πειράματα των συλλοιμώξεων προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα για κάθε μόριο:

Η ενδονουκλεάση FEN 1 στα κύτταρα μολυσμένα με Επ στις 2, 4 και 24 ώρες παρουσιάζει μια τάση αύξησης σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία έγινε συλλοίμωξη και με τα 2 βακτήρια, Επ και *E.coli*. Στη 1 ώρα τα αποτελέσματα για την FEN 1 είναι αντίθετα, με μικρή αύξηση του μορίου να παρατηρείται στη συλλοίμωξη. Συγκριτικά με τα αμόλυντα κύτταρα η FEN 1 στα μολυσμένα κύτταρα βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα στις 2 και 24 ώρες, ενώ στη 1 και στις 4 ώρες τα επίπεδα του μορίου είναι χαμηλότερα στα αμόλυντα κύτταρα (Διάγραμμα 9).

FEN 1 -Συλλοίμωξη σε GES-1

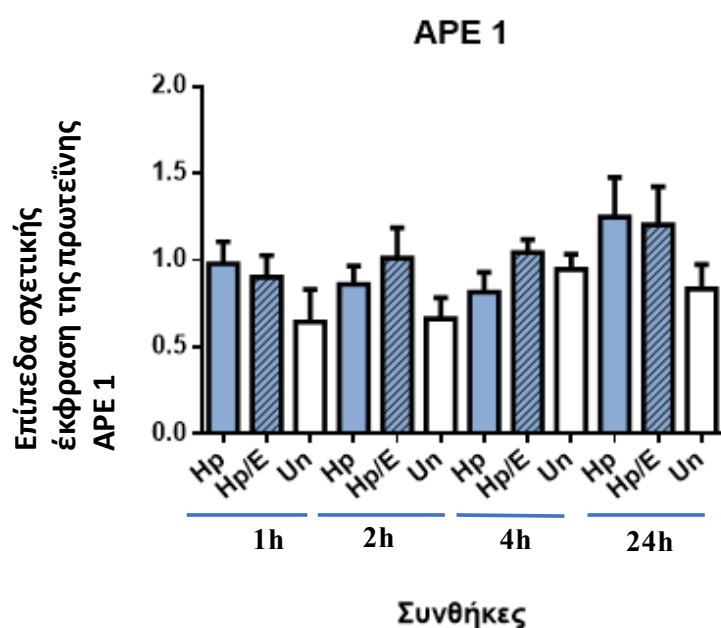


Διάγραμμα 9: Διαγράμμα της σχετικής έκφρασης της FEN 1 σε κυττάρα GES-1 για συνθήκες Επ Λοίμωξης (Hp), Συλλοίμωξης (Hp/E) και αμόλυντα κύτταρα (Un). Τα διαγράμματα προέκυψαν από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπώματων κατά Western. Συνοδευτικά του διαγράμματος παρατίθενται αντιπροσωπευτικά στυπώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος με το αντίστοιχο στύπωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH). (Παράρτημα 3 Α)

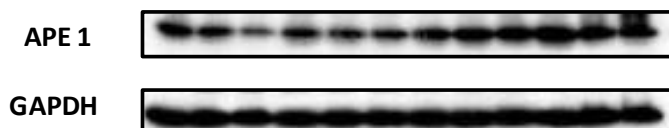


Η ενδονουκλεάση **APE 1** στη λοίμωξη και συλλοίμωξη παρατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα αμόλυντα στις 1, 2 και 24 ώρες. Στις 2 και 4 ώρες τα επίπεδα της πρωτεΐνης εμφανίζουν μικρή αύξηση στη συλλοίμωξη συγκριτικά με την απλή λοίμωξη (**Διάγραμμα 10**). Η διαφοροποίηση της έκφρασης για τα δυο αυτά μόρια δεν αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική, λόγω του περιορισμένου αριθμού βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.

APE 1-Συλλοίμωξη σε GES-1

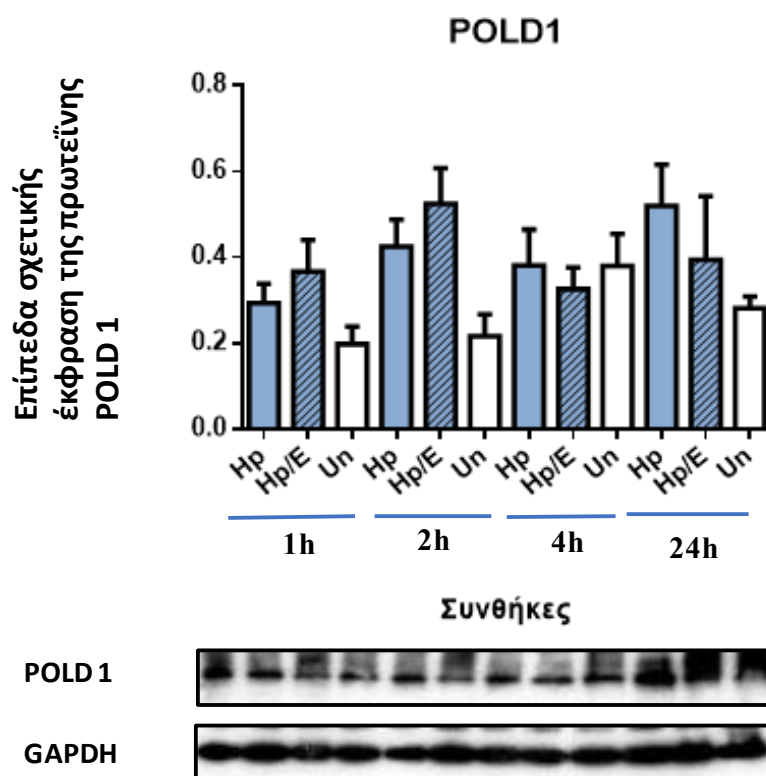


Διάγραμμα 10: Διαγράμμο της σχετικής έκφρασης της APE 1 σε κυττάρα GES-1 για συνθήκες Επ Λοίμωξης (Hp), Συλλοίμωξης (Hp/E) και αμόλυντα κύτταρα (Un). Τα διαγράμματα προέκυψαν από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοοτυπώματων κατά Western. Συνοδευτικά του διαγράμματος παρατίθενται αντιπροσωπευτικά οτυπώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος με το αντίστοιχο στύπωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH). (Παράρτημα 3 Β)



Στα πειράματά συλλοίμωσης για την πολυμεράση **POLD 1** τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται στα μολυσμένα κύτταρα σε σύγκριση με τα αμόλυντα στις 1, 2 και 24 ώρες, ενώ στις 4 ώρες φαίνεται να μειώνεται. Όσον αφορά στη διαφορά έκφρασης ανάμεσα στα κύτταρα λοίμωξης και συλλοίμωσης στις πρώτες 2 ώρες το επίπεδο του μορίου είναι αυξημένο στη συλλοίμωση. Αντίθετα, στις 4 και 24 ώρες η POLD 1 βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα της απλής λοίμωξης (**Διάγραμμα 11**).

POLD 1-Συλλοίμωση σε GES-1

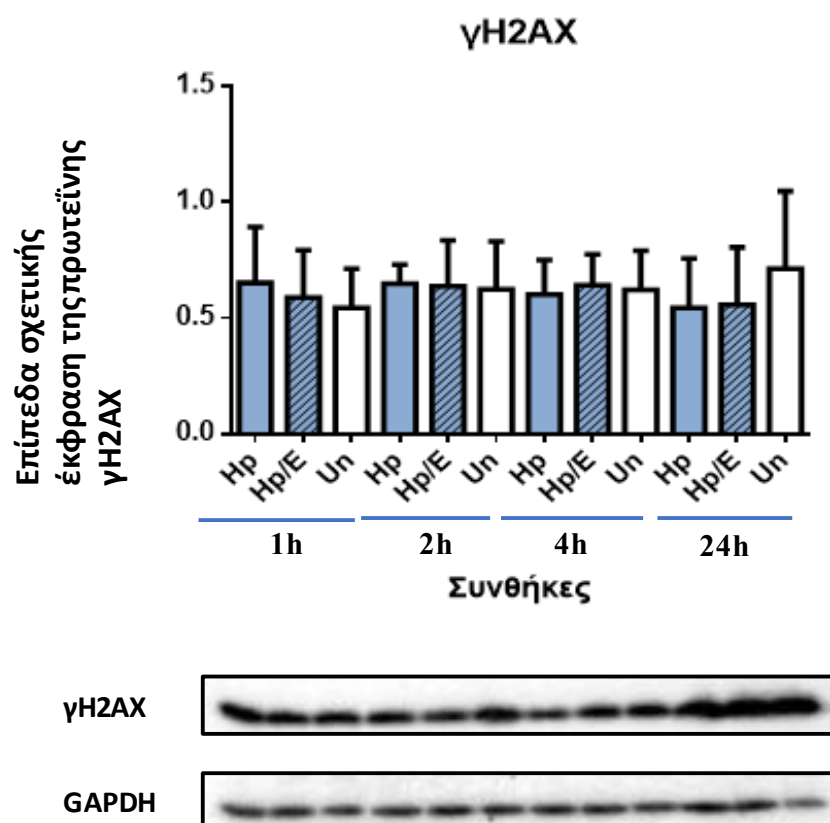


Διάγραμμα 11: Διαγράμμο της σχετικής έκφρασης της POLD 1 σε κυττάρα GES-1 για συνθήκες Επ Λοίμωξης (Hp), Συλλοίμωσης (Hp/E) και αμόλυντα κύτταρα (Un). Τα διαγράμματα προέκυψαν από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπώματων κατά Western. Συνοδευτικά του διαγράμματος παρατίθενται αντιπροσωπευτικά στυπώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος με το αντίστοιχο στύπωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH). (Παράρτημα 3 Δ)

Τέλος για τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη γ H2AX δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διακύμανση στα επίπεδα της πρωτεΐνης ανάμεσα στα δείγματα της λοίμωξης της συλλοίμωσης και στα αμόλυντα (**Διάγραμμα 12**). Στο σύνολο των αποτελεσμάτων, λόγω του περιορισμένου αριθμού

βιολογικών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν δεν αναδείχθηκε στατιστική σημαντικότητα για τις διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στα γραφήματα.

γH2AX-Συλλοίμωξη σε GES-1



Διάγραμμα 12: Διαγράμμα της σχετικής έκφρασης της POLD 1 σε κυττάρα GES-1 για συνθήκες Επ Λοίμωξης (Hp), Συλλοίμωξης (Hp/E) και αμόλυντα κύτταρα (Un). Τα διαγράμματα προέκυψαν από ποσοτικοποιήσεις του συνόλου των μετρήσεων όλων των ανοσοστυπώματων κατά Western. Συνοδευτικά του διαγράμματος παρατίθενται αντιπροσωπευτικά στυπώματα για τα μόρια ενδιαφέροντος με το αντίστοιχο στύπωμα για το γονίδιο αναφοράς (GAPDH). (Παράρτημα 3 Γ)

Δ. Συζήτηση

Το ελικοβακτήριο του πυλωρού χαρακτηρίστηκε το 1994 ως καρκινογόνο πρώτης τάξεως από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.²¹ Η εμμένουσα Επ λοίμωξη αποτελεί βασικό παράγοντα ανάπτυξης γαστρικής παθολογίας, όπως το δωδεκαδακτυλικό έλκος, το MALT λέμφωμα και το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα. Η κλινική εικόνα της λοίμωξης και η συσχέτιση της με την ανάπτυξη των παθήσεων που προαναφέρθηκαν έχει πολλές εκφάνσεις, σε κάθε περίπτωση ενέχονται πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων παθογένειας του βακτηρίου του γενετικού υποβάθρου του ξενιστή, αλλά και εξωγενών παραγόντων όπως το περιβάλλον διαβίωσης και η διατροφή.⁶¹

Η επίδραση της Επ λοίμωξης στη φυσιολογία και μορφολογία των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος έχει καταδειχθεί από πληθώρα μελετών.^{22,62} Παρόλο που οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί έχει αναγνωριστεί ο κρίσιμος ρόλος του βακτηρίου στην επαγωγή κυτταρικού στρες, χρόνιας φλεγμονής αλλά και στην απορρύθμιση θεμελιωδών κυτταρικών διεργασιών.^{51,63} Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ο καίριος ρόλος της Επ λοίμωξης και στην καρκινογένεση μέσω της επιρροής του βακτηρίου στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA του ξενιστή μέσω απορρύθμισης βασικών για τη λειτουργία τους γονιδίων.⁴⁵⁻⁴⁷ Μελέτες στο μεταγράφομα και την πρωτεϊνική έκφραση κυττάρων επιμολυσμένων με Επ επιβεβαιώνουν την ικανότητα του παθογόνου να απορρυθμίζει και να εμπλέκεται στους βασικούς μηχανισμούς αναγνώρισης, απόκρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Για πληθώρα μορίων, συσχετιζόμενων με τις παραπάνω διαδικασίες, έχει παρατηρηθεί σημαντική απόκλιση στην έκφραση σε τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα προσομοίωσης φυσιολογικών συνθηκών έναντι της Επ λοίμωξης.⁴⁵

Στο σύνολο της υπάρχουσας βιβλιογραφίας τα αποτελέσματα διαφορετικών ερευνών πάνω στη επίδραση του *H. pylori* στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, συγκλίνουν ή και αντικρούονται, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην διαφοροποίηση των πειραματικών συνθηκών. Δεδομένης της πολυπαραγοντικής φύσης της λοίμωξης και του περιβάλλοντος στο οποίο δραστηριοποιείται και αλληλεπιδρά το βακτήριο, παράγοντες όπως η χρονική διάρκεια της λοίμωξης, το MOI και το γενετικό προφίλ του ξενιστή-μοντέλου δύναται να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της λοίμωξης.^{62,64}

Η έρευνα πάνω στο Επ τα τελευταία χρόνια προσανατολίζεται όλο και περισσότερο το σύνολο του γαστρεντερικού μικροβιώματος. Είναι πλέον σαφές ότι η προσομοίωση της πορείας της Επ λοίμωξης δεν μπορεί να καταστεί πλήρως κατανοητή χωρίς να ληφθεί υπόψιν η αλληλεπίδραση του βακτηρίου με το υπόλοιπο ανθρώπινο μικροβίωμα, το οποίο ανά πάσα στιγμή αποτελείται από εκατομμύρια δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Μέχρι τώρα δεν υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία για την επίδραση της συλλοίμωξης δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών στους μηχανισμούς δράσης του ελικοβακτηρίου του πυλωρού.^{58,59}

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα προκειμένου να μελετηθούν τα αποτελέσματα της συλλοίμωξης του Επ με το στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας του ΕΠΠ διερευνήθηκε η επίδραση της συλλοίμωξης των 2 βακτηρίων στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και την επαγωγή γενωμικού στρες με πρωτοκόλλα λοίμωξης 24 και 72 ωρών για Επ και συλλοίμωξης με *E. coli* διάρκειας 3 ωρών. Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν σημαντική απορρύθμιση των μορίων FEN 1, RAD 51 και γH2AX και τάσεις απορρύθμισης για την POLD 1. Σε αυτή την πτυχιακή εργασία τα πρωτοκόλλα συλλοίμωξης τροποποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση των 2 παθογόνων σε πρώιμα στάδια της λοίμωξης. Ειδικότερα, για το Επ η διάρκεια της λοίμωξης ήταν 1, 2, 4 και 24 ώρες με τη συνθήκη της συλλοίμωξης με κολοβακτηρίδιο να έχει διάρκεια μίας ώρας σε κύτταρα GES-1. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των μορίων FEN 1, POLD 1, APE 1 και γH2AX για κάθε μια από τις παραπάνω συνθήκες.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα μονολοίμωξης με Επ σε AGS και GES-1 κύτταρα σε μια προσπάθεια να επιβεβαιωθούν τα υπάρχοντα δεδομένα για την επίδραση της λοίμωξης στα AGS αλλά και πιθανές διαφορές στην απόκριση ανάμεσα στις 2 κυτταροσειρές, δεδομένων των θεμελιωδών διαφορών στην φυσιολογία των 2 κυτταρικών μοντέλων. Η κυτταρική σειρά AGS προέρχεται από γυναίκα 54 ετών, ασθενή με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (συμφώνα με την ταξινόμηση κατά Lauren) η οποία δεν είχε λάβει καμία θεραπεία. Αντιθέτως, τα GES-1 είναι εμβρυικής προέλευσης κύτταρα γαστρικού επιθήλιου, αθανатоποιημένα μετά από μετασχηματισμό με ιό SV-40. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που τα GES-1 θεωρούνται φυσιολογικά κύτταρα η εικόνα του καρυότυπου τους δεν είναι φυσιολογική (αδημοσίευτα αποτελέσματα εργαστηρίου). Κυτταρικές σειρές γαστρικού αδενοκαρκινώματος όπως η AGS και η MKN28 χρησιμοποιούνται συχνά για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του Επ με το γαστρικό επιθήλιο. Τα κύτταρα αυτά έχουν πιθανώς συσσωρεύσει μεταλλάξεις, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εξέλιξης τους, με αποτέλεσμα το γονιδίωμα τους να διαφέρει

σημαντικά από αυτό των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του στομάχου. Επομένως δεν μπορεί να είναι σίγουρο ότι οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται πειραματικά, αντικατοπτρίζουν πλήρως αυτές ανάμεσα στο Επ και στο γαστρικό επιθήλιο. Αρκετές μελέτες προκειμένου να προσομοιάσουν, όσο γίνεται, τις πραγματικές συνθήκες λοίμωξης διεξήχθησαν με τη χρήση αθανатоποιημένων σειρών όπως η GES-1.⁶⁵ Σε πρωτεωμική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για να γίνει σύγκριση στην έκφραση πρωτεϊνών συνδεδεμένων με τον καρκίνο, ανάμεσα στα GES-1 και σε αδενοκαρκινικές κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην έκφραση 22 πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκου, με κάποιες από αυτές να συνδέονται ειδικότερα με τον γαστρικό καρκίνο. Οι λειτουργίες αυτών των μορίων εμπλέκονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη κυτταρική σηματοδότηση, διαφοροποίηση και απόπτωση, αλλά και με την καρκινική μετάσταση και διείσδυση.⁶⁶ Σε διδακτορική διατριβή του εργαστηρίου που πραγματοποιήθηκε για την μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών, συνδεδεμένων με την έκφραση των MMP3 και MMP9, σε AGS και GES-1 κύτταρα μετά από λοίμωξη με Επ, παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δυο κυτταροσειρών στη ρύθμιση δυο οδών μεταγωγής σήματος των MAPK JNK και του p38. Η διαφορετική απόκριση που διαπιστώθηκε πιθανώς οφειλόταν στο διαφορετικό γενετικό προφίλ των AGS σε σύγκριση με τα GES-1, καθώς τα αδενοκαρκινικά κύτταρα μεταφέρουν στο γονιδίωμα τους πληθώρα μεταλλάξεων, μια εκ των οποίων είναι η G12D στο γονίδιο KRAS, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι συνεχώς ενεργοποιημένο και επομένως χωρίς δυνατότητα αναστολής με χρήση χημικών αναστολέων των συγκεκριμένων MAPK κινασών⁶⁷

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της πτυχιακής, όσον αφορά την μονολοίμωξη σε AGS κύτταρα για τα μόρια που μελετήθηκαν συμφωνούσαν με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου και με μέρος της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για την 24ώρη λοίμωξη. Για τα προγενέστερα στάδια της λοίμωξης στα μόρια FEN 1 και τη γH2AX φαίνεται η επίδραση του Επ να ενισχύεται σταθερά με το πέρασ του χρόνου. Για την ενδονουλεάση APE 1 η εικόνα δεν είναι ξεκάθαρη με αρκετές αμελητέες διακυμάνσεις στην έκφρασης της στις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν. Η πολυμεράση POLD 1 παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, με σημαντική αυξορρόθμιση στις 4 ώρες μετά τη λοίμωξη και μειορρόθμιση στις εκατέρωθεν χρονικές στιγμές (2 και 24 ώρες) αναδεικνύοντας την πιθανότητα χρονοεξαρτώμενης περιοδικότητας στην έκφραση, η οποία όμως για να αποδειχθεί χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Για την μονολοίμωση Επ σε GES-1 δεν υπάρχει διαθέσιμη εκτενής βιβλιογραφία προς σύγκριση αποτελεσμάτων, παρόλα αυτά σε σύγκριση με προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου για 24-ώρη λοίμωξη GES-1 με Επ τα αποτελέσματα συμφωνούν για μειορρύθμιση της ενδονουκλεάσης FEN 1, μειορρύθμιση της πολυμεράσης POLD 1 και αυξορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γH2AX. Όσον αφορά τα πρώιμα στάδια λοίμωξης (1, 2, 4 ώρες) δεν υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία από παρόμοια έρευνα προς επιβεβαίωση και σύγκριση αποτελεσμάτων. Η FEN 1 και η γH2AX στα αρχικά στάδια έχουν εικόνα παρόμοια με αυτή στα AGS, η APE 1 παρουσιάζει μια σταδιακή και μικρή μείωση από τη 1 έως τις 4 ώρες, αποτέλεσμα που δεν συμβαδίζει με αυτό των AGS κυττάρων. Τέλος για την πολυμεράση POLD 1 στα GES-1 σε πρώιμα στάδια φαίνεται τα επίπεδα της να είναι υψηλά στη 1 ώρα, ακολουθεί μείωση στις 2 ώρες και μικρή επάνοδος των επιπέδων στις 4 για να ξαναμειωθούν τα επίπεδα, στις 24 ώρες. Παρόλο που οι διακυμάνσεις αυτές δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα στα AGS κύτταρα, δημιουργούν το ερώτημα πιθανής χρονοεξαρτώμενης περιοδικής έκφρασης της πρωτεΐνης, υπόθεση που χρήζει επίσης, περαιτέρω έρευνας. Να σημειωθεί ότι, παρόμοια υπόθεση για την έκφραση της POLD 1, σχετιζόμενη ή μη-με βακτηριακή λοίμωξη δεν βρέθηκε καταγεγραμμένη βιβλιογραφικά.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτής της πτυχιακής για τη συλλοίμωση Επ και *E. coli* σε GES-1 κύτταρα στις 24 ώρες ήταν σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου για την μειορρύθμιση της FEN 1 και την αυξορρύθμιση της POLD 1 όσον αφορά την σύγκριση, των πρωτεϊνικών επιπέδων στις 24 ώρες, σε συνθήκες συλλοίμωσης και στα αμόλυντα κύτταρα. Ενώ αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την σύγκριση των δειγμάτων μονολοίμωσης με αυτά της συλλοίμωσης (24 ωρών) για τις 2 αυτές πρωτεΐνες αλλά και για τη γH2AX. Για τις πρώιμες ώρες της λοίμωξης μικρές διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν στα επίπεδα της έκφρασης, κυρίως μετά τις 2 ώρες, για συνθήκες συλλοίμωσης συγκριτικά με τη απλή λοίμωξη, χωρίς κάποια από τις διαφορές να αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πρωτόκολλο της συλλοίμωσης διέφερε ως προς τη χρονική διάρκεια της συλλοίμωσης (3ώρη επώαση *E. coli*). Στην APE 1 παρατηρούνται αμελητέες διαφορές στην έκφραση ανάμεσα σε λοίμωξη και συλλοίμωση στο πέραςμα του χρόνου, όμως και οι 2 συνθήκες εμφανίζουν αυξημένη την πρωτεΐνη συγκριτικά με τα αμόλυντα κύτταρα σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν.

Ο αριθμός των αποτελεσμάτων για τα πειράματα συλλοίμωσης δεν ανέδειξε στατιστική σημαντικότητα για κάποιο από τα 4 μόρια που μελετήθηκαν στις ορισμένες χρονικές στιγμές. Κάποιες τάσεις απορρυθμίσεις που παρατηρήθηκαν συμφωνούσαν με προηγούμενα

αποτελέσματα από πειράματα συλλοίμωσης Επ και κολοβακτηρίδιου, για πρωτόκολλο συλλοίμωσης μεγαλύτερης διάρκειας. Ταυτόχρονα, τα δεδομένα που συλλέχθηκαν για τις πρώιμες ώρες λοίμωξης Επ με ύστερη συλλοίμωση με *E. coli* σχηματίζουν παρουσιάζουν διαφορικές τάσεις απορρύθμισης για κάθε μόριο. Η εικόνα που προέκυψε για κάθε μόριο ήταν πιθανόν αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο ελικοβακτήριο του πυλωρού το *E. coli* και το κύτταρο. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν μέχρι να γίνουν πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους αλληλοεπηρεάζονται οι τρεις αυτοί οργανισμοί, καθώς οι παράγοντες που δύναται να αλλάζουν κάθε φορά τη μεταξύ τους δυναμική, όπως είναι ο χρόνος λοίμωξης, η χρονική διάρκεια της συλλοίμωσης και το στάδιο στο οποίο ξεκινήσει, το γενετικό προφίλ του ξενιστή και των στελεχών παθογένειας. Ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση πιθανής διαφοροποίησης των μηχανισμών και της απόκρισης στη λοίμωξη ανάμεσα στις 2 κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να μελετηθεί ο κυτταρικός τύπος που προσομοιάζει καλύτερα τις συνθήκες της λοίμωξης στον άνθρωπο.

Βιβλιογραφία

1. Percival, S. L. & Williams, D. W. Chapter Seven - *Helicobacter pylori*. in *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)* (eds. Percival, S. L., Yates, M. V, Williams, D. W., Chalmers, R. M. & Gray, N. F.) 119–154 (Academic Press, 2014). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00007-X>.
2. Warren, J. R. & Marshall, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1273–5 (1983).
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **100**, 1–441 (2012).
4. Atherton, J. C. & Blaser, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* **119**, 2475–87 (2009).
5. Kao, C.-Y., Sheu, B.-S. & Wu, J.-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J* **39**, 14–23 (2016).
6. Sgouras, D., Tegtmeyer, N. & Wessler, S. Activity and Functional Importance of *Helicobacter pylori* Virulence Factors. *Adv Exp Med Biol* **1149**, 35–56 (2019).
7. Hazell, S. L., Lee, A., Brady, L. & Hennessy, W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* **153**, 658–63 (1986).
8. Dubois, A. & Borén, T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* **9**, 1108–1116 (2007).
9. Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M. & Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* **19**, 449–490 (2006).
10. Ernst, P. B. & Gold, B. D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* **54**, 615–40 (2000).
11. Kotilea, K., Bontems, P. & Touati, E. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection. in 17–33 (2019). doi:[10.1007/5584_2019_357](https://doi.org/10.1007/5584_2019_357).
12. Falkeis-Veits, C. & Vieth, M. Non-malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. in 121–134 (2019). doi:[10.1007/5584_2019_362](https://doi.org/10.1007/5584_2019_362).
13. Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* **48**, 3554–60 (1988).
14. Martinson, J. N. V. & Walk, S. T. *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus* **9**, (2020).
15. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123–140 (2004).
16. Gatsios, A., Kim, C. S. & Crawford, J. M. *Escherichia coli* small molecule metabolism at the host–microorganism interface. *Nat Chem Biol* **17**, 1016–1026 (2021).

17. Khare, A. & Tavazoie, S. Multifactorial Competition and Resistance in a Two-Species Bacterial System. *PLoS Genet* **11**, e1005715 (2015).
18. Chandraprasad, M. S., Dey, A. & Swamy, M. K. Introduction to cancer and treatment approaches. in *Paclitaxel* 1–27 (Elsevier, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-90951-8.00010-2.
19. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
20. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
21. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **61**, 1–241 (1994).
22. Correa, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* **19 Suppl 1**, S37–43 (1995).
23. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202–209 (2014).
24. Jeggo, P. A., Pearl, L. H. & Carr, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer* **16**, 35–42 (2016).
25. Das, B., Choudhury, B., Kumar, A. & Jyoti Baruah, V. Genomic Instability and DNA Repair in Cancer. in *DNA - Damages and Repair Mechanisms* (IntechOpen, 2021). doi:10.5772/intechopen.95736.
26. Chatterjee, N. & Walker, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* **58**, 235–263 (2017).
27. Hegde, M. L., Hazra, T. K. & Mitra, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**, 27–47 (2008).
28. Lee, T.-H. & Kang, T.-H. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int J Mol Sci* **20**, 6092 (2019).
29. Ignatov, A. V., Bondarenko, K. A. & Makarova, A. V. Non-bulky Lesions in Human DNA: the Ways of Formation, Repair, and Replication. *Acta Naturae* **9**, 12–26 (2017).
30. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. J. & Hoeijmakers, J. H. J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**, 768–785 (1999).
31. Dip, R., Camenisch, U. & Naegeli, H. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1409–1423 (2004).
32. Curtin, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* **12**, 801–817 (2012).
33. Mehta, A. & Haber, J. E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016428–a016428 (2014).
34. Lewin Benjamin Jocelyn E. Krebs Elliott S. Goldstein and Stephen T. Kilpatrick. 2018. Lewin's Genes Xii. [12Th edition] ed. Burlington Massachusetts: Jones & Bartlett Learning. *GENES XII*.

35. Grundy, G. J., Moulding, H. A., Caldecott, K. W. & Rulten, S. L. One ring to bring them all—The role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **17**, 30–38 (2014).
36. Daley, J. M., Gaines, W. A., Kwon, Y. & Sung, P. Regulation of DNA pairing in homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a017954 (2014).
37. Ernst, P. B. & Gold, B. D. The Disease Spectrum of *Helicobacter Pylori* : The Immunopathogenesis of Gastroduodenal Ulcer and Gastric Cancer. *Annu Rev Microbiol* **54**, 615–640 (2000).
38. Salvatori, S., Marafini, I., Laudisi, F., Monteleone, G. & Stolfi, C. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Pathogenetic Mechanisms. *Int J Mol Sci* **24**, 2895 (2023).
39. Yamaoka, Y. *et al.* Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* **37**, 2274–9 (1999).
40. Sougleri, I. S. *et al.* 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 Journal* **283**, 206–220 (2016).
41. Papadakos, K. S., Sougleri, I. S., Mentis, A. F., Hatziloukas, E. & Sgouras, D. N. Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in Helicobacter pylori CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats. *PLoS One* **8**, e56291 (2013).
42. Suzuki, M. *et al.* Helicobacter pylori CagA Phosphorylation-Independent Function in Epithelial Proliferation and Inflammation. *Cell Host Microbe* **5**, 23–34 (2009).
43. Zhang, W. & Xu, J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark Res* **5**, 1 (2017).
44. Yao, Y., Tao, H., Park, D. II, Sepulveda, J. L. & Sepulveda, A. R. Demonstration and Characterization of Mutations Induced by Helicobacter pylori Organisms in Gastric Epithelial Cells. *Helicobacter* **11**, 272–286 (2006).
45. Kontizas, E. *et al.* Impact of Helicobacter pylori Infection and Its Major Virulence Factor CagA on DNA Damage Repair. *Microorganisms* **8**, 2007 (2020).
46. Machado, A. M. D. *et al.* Helicobacter pylori Infection Induces Genetic Instability of Nuclear and Mitochondrial DNA in Gastric Cells. *Clinical Cancer Research* **15**, 2995–3002 (2009).
47. Toller, I. M. *et al.* Carcinogenic bacterial pathogen Helicobacter pylori triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 14944–14949 (2011).
48. Ding, S.-Z. *et al.* Helicobacter pylori and H2O2 increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **127**, 845–858 (2004).
49. Futagami, S. *et al.* Expression of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease-1 (APE-1) in H. pylori-Associated Gastritis, Gastric Adenoma, and Gastric Cancer. *Helicobacter* **13**, 209–218 (2008).
50. SHANKS, A.-M. & EL-OMAR, E. M. Helicobacter pylori infection, host genetics and gastric cancer. *J Dig Dis* **10**, 157–164 (2009).
51. Chumduri, C., Gurumurthy, R. K., Zietlow, R. & Meyer, T. F. Subversion of host genome integrity by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 659–673 (2016).

52. Liu, X., Irfan, M., Xu, X., Tay, C.-Y. & Marshall, B. J. *Helicobacter pylori* infection induced genome instability and gastric cancer. *Genome Instab Dis* **1**, 129–142 (2020).
53. Iino, C. & Shimoyama, T. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gut microbiota. *World J Gastroenterol* **27**, 6224–6230 (2021).
54. Tao, Z., Han, J. & Fang, J. *Helicobacter pylori* infection and eradication: Exploring their impacts on the gastrointestinal microbiota. *Helicobacter* **25**, (2020).
55. Malfertheiner, P. *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* **66**, 6–30 (2017).
56. Parsons, B. N. *et al.* Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLoS Pathog* **13**, e1006653 (2017).
57. Bakhti, S. Z. & Latifi-Navid, S. Interplay and cooperation of *Helicobacter pylori* and gut microbiota in gastric carcinogenesis. *BMC Microbiol* **21**, 258 (2021).
58. Fakharian, F. *et al.* The interplay between *Helicobacter pylori* and the gut microbiota: An emerging driver influencing the immune system homeostasis and gastric carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, (2022).
59. Zhang, L., Zhao, M. & Fu, X. Gastric microbiota dysbiosis and *Helicobacter pylori* infection. *Front Microbiol* **14**, (2023).
60. Ke, Y., Ning, T. & Wang, B. [Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **16**, 7–10 (1994).
61. Yamaoka, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 629–641 (2010).
62. Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J. & Kusters, J. G. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* **6**, 699–709 (2006).
63. Bessède, E., Dubus, P., Mégraud, F. & Varon, C. *Helicobacter pylori* infection and stem cells at the origin of gastric cancer. *Oncogene* **34**, 2547–2555 (2015).
64. Ozbey, G., Hanafiah, A. & Sproston, E. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Microbiota. *Euroasian J Hepatogastroenterol* **10**, 36–41 (2020).
65. Liu, Z.-F. *et al.* Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **55**, 1009–1015 (2006).
66. Jing Zang^{1, #}, Ping Wang^{1, 2, #}, Sanyou Gao³, Di Xiao⁴, Jianzhong Zhang⁴, Kaijuan Wang^{1, .} Differential proteins expression between gastric cancer and normal cell lines. (2008).
67. Karayiannis, I. *et al.* Induction of *MMP*-3 and *MMP*-9 expression during *Helicobacter pylori* infection via *MAPK* signaling pathways. *Helicobacter* **28**, (2023).
68. Molina-Castro, S., Ramírez-Mayorga, V. & Alpízar-Alpízar, W. Priming the seed: *Helicobacter pylori* alters epithelial cell invasiveness in early gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol* **10**, 231–243 (2018).

69. Prieto-Garcia, C. USP28 regulates Squamous cell oncogenesis and DNA repair via ΔNp63 deubiquitination. (2022). doi:10.25972/OPUS-27033.
70. Pormohammad, A. *et al.* Global estimate of gastric cancer in *Helicobacter pylori* –infected population: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol* **234**, 1208–1218 (2019).

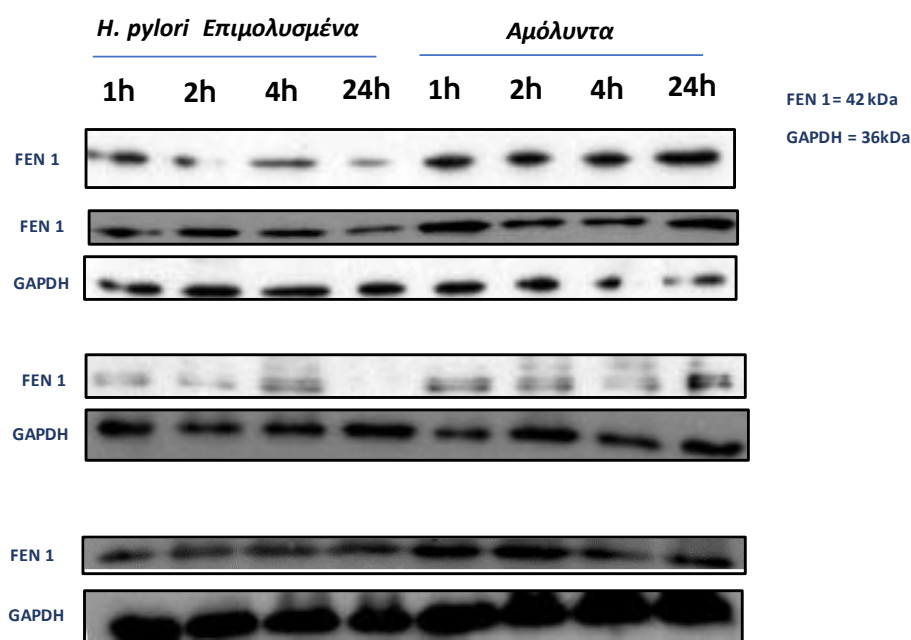
Παράρτημα

Στα παρακάτω παραρτήματα παρατίθεται το σύνολο των στυπωμάτων που πραγματοποιήθηκαν και από των οποίων την ανάλυση προέκυψε το σύνολο των αποτελεσμάτων, για κάθε μόριο που μελετήθηκε με την αντίστοιχη πρωτεΐνη αναφοράς (GAPDH),

Παράρτημα 1

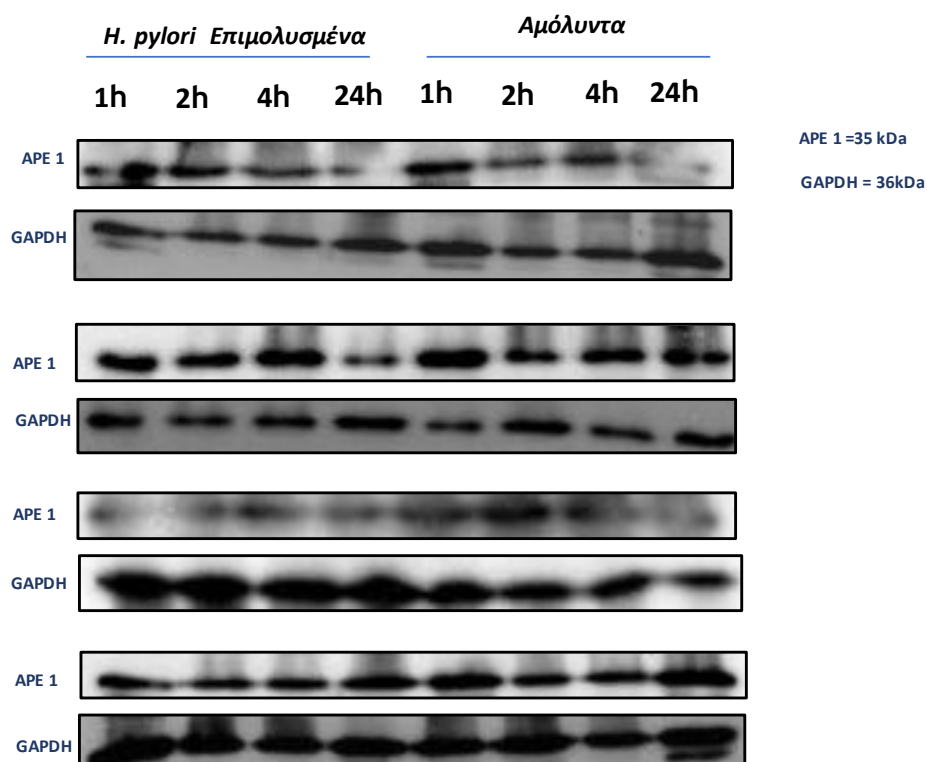
A.

AGS cells- FEN 1



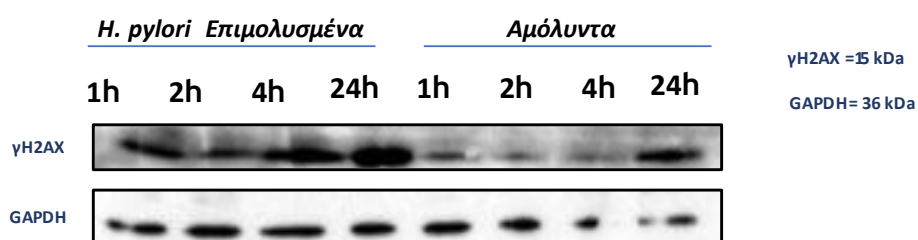
Β.

AGS cells–APE 1



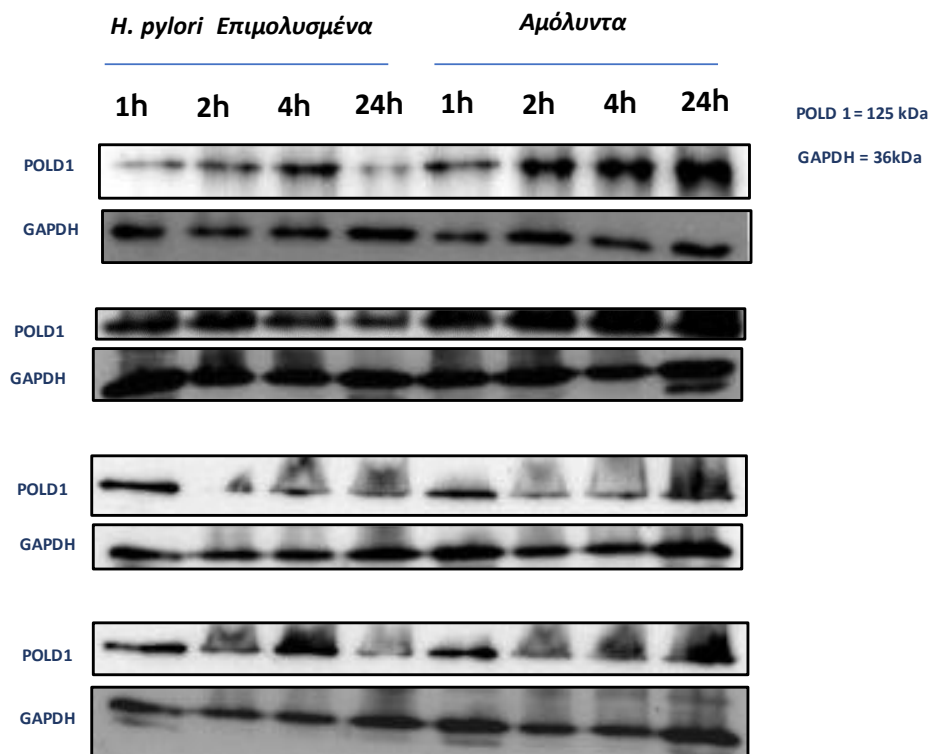
Γ.

AGS cells–γH2AX



Δ.

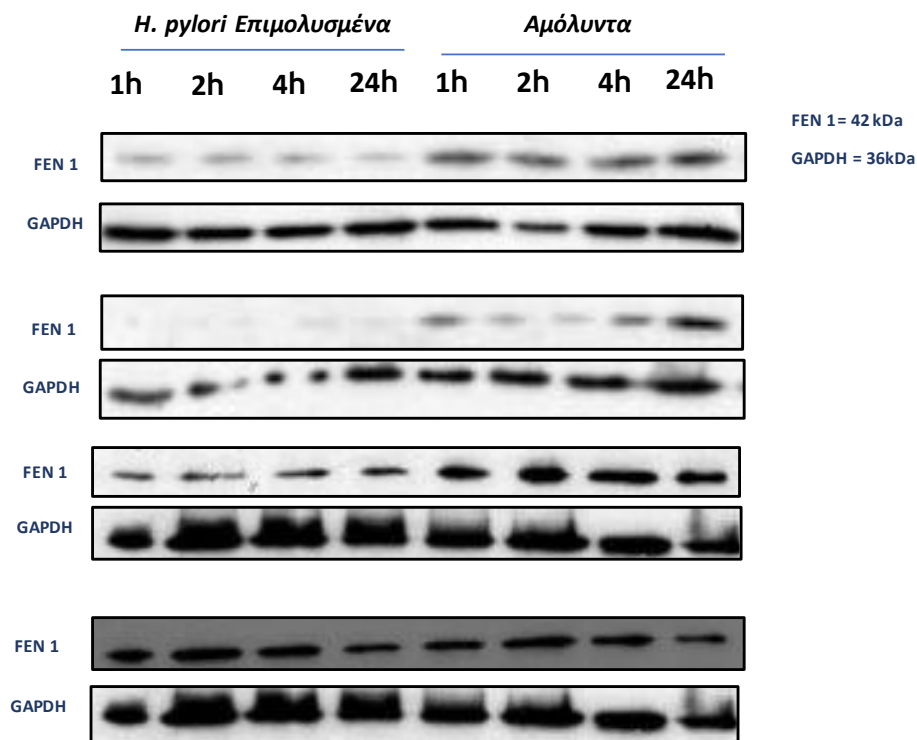
AGS cells– POLD 1



Παράρτημα 2

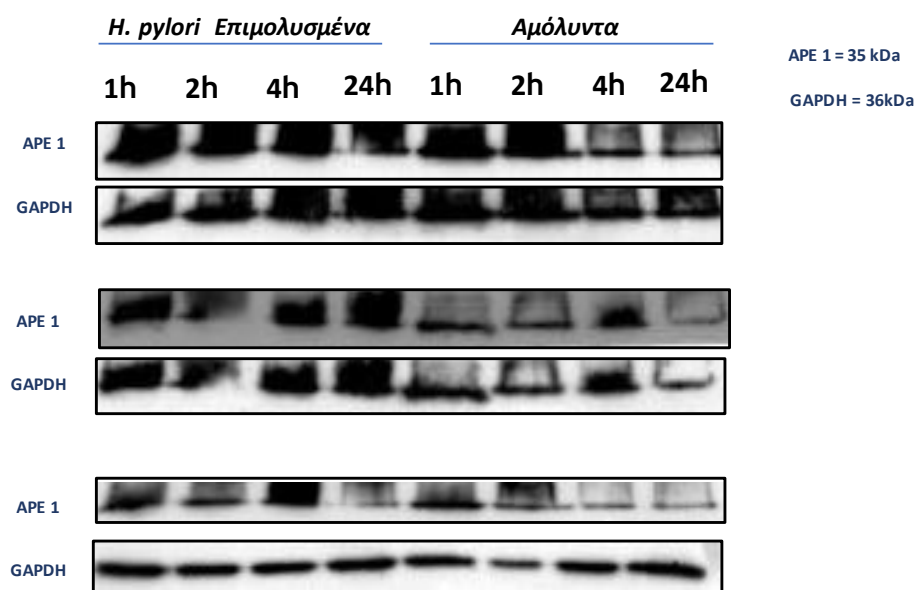
GES1 cells- FEN 1

A.



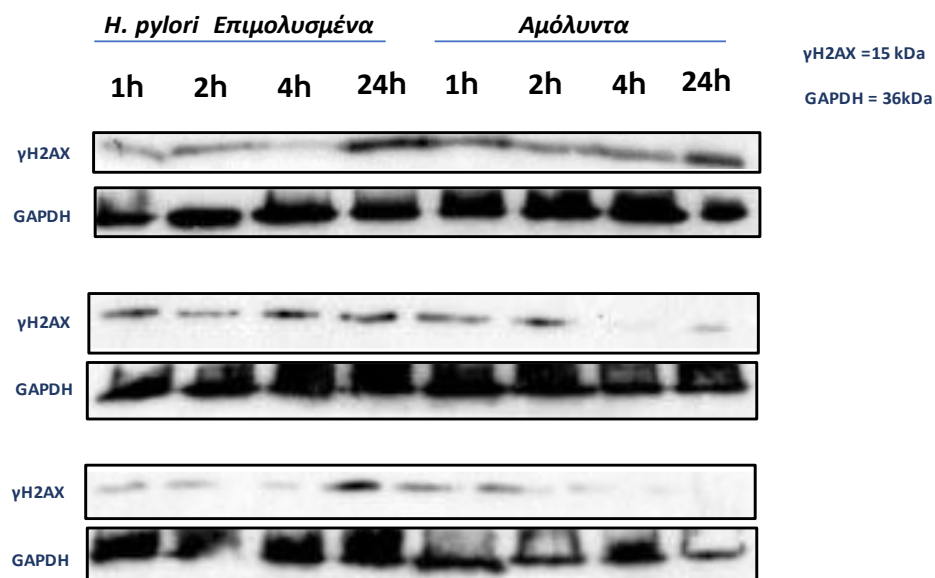
B.

GES1 cells- APE 1



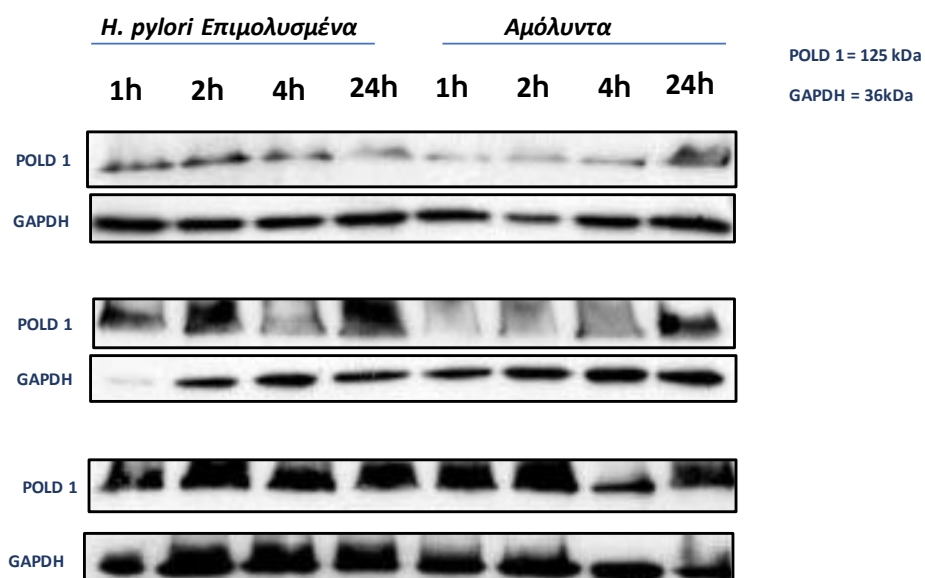
Γ.

GES1 cells- γ H2AX



Δ.

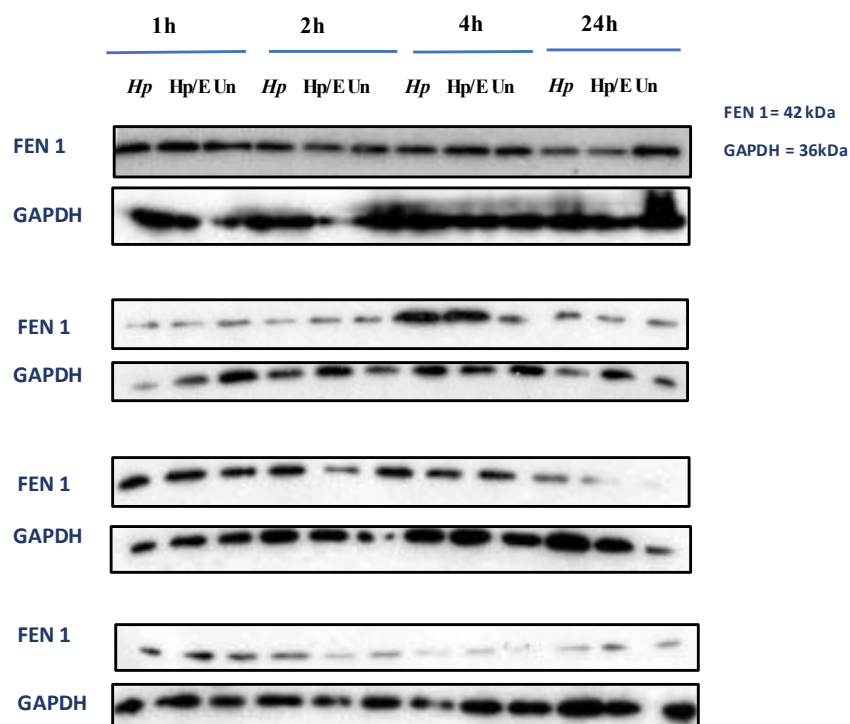
GES1 cells- POLD 1



Παράρτημα 3

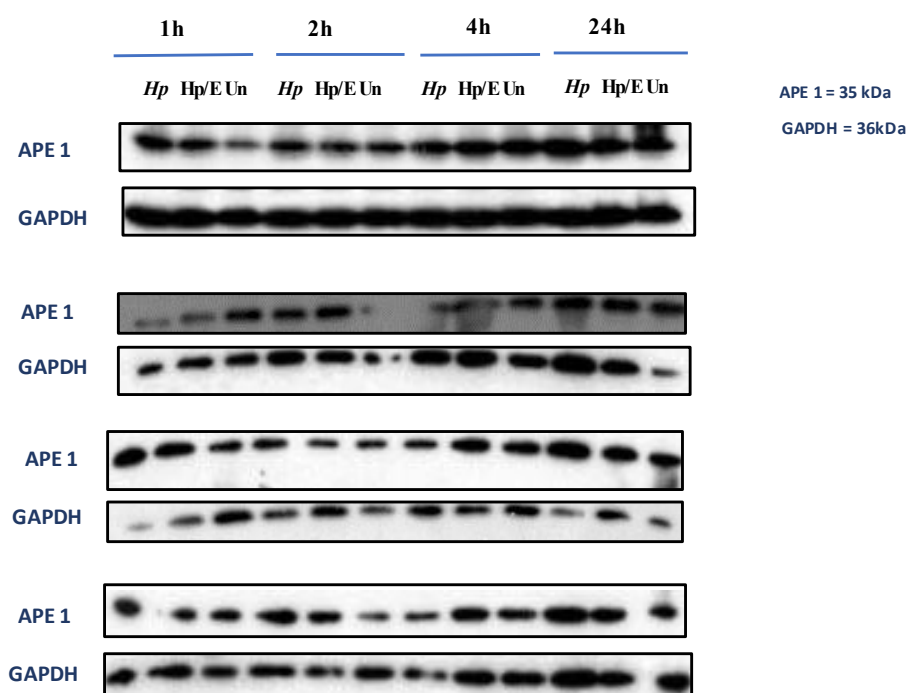
A.

Συλλοίμωξη *H.p/E.c* GES-1 FEN 1



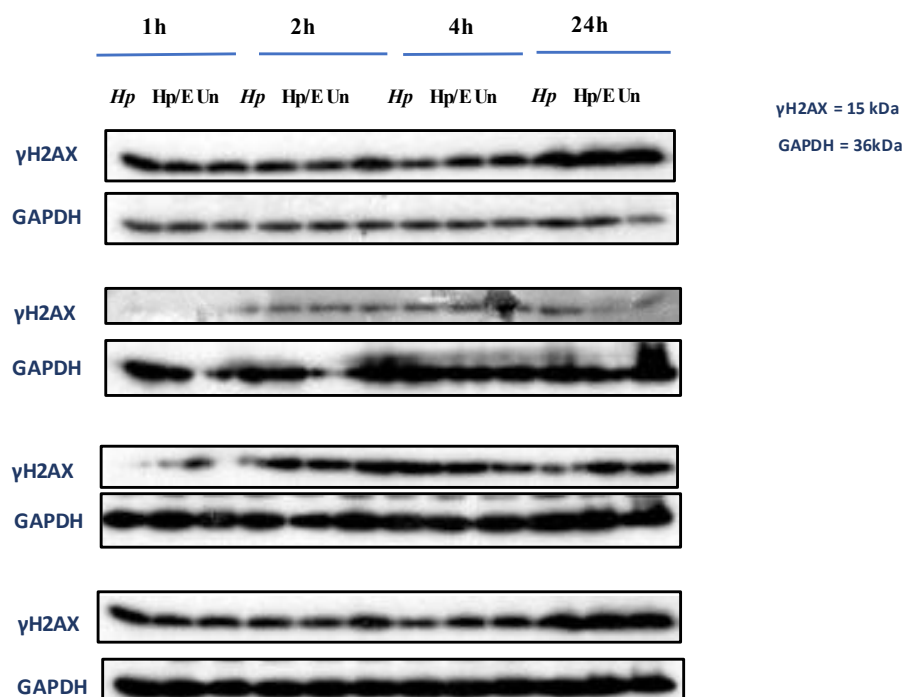
B.

Συλλοίμωξη *H.p/E.c* GES-1 APE 1



Γ.

Συλλοίμωξη *H.p/E.c* GES-1 γH2AX



Δ.

Συλλοίμωξη *H.p/E.c* GES-1 POLD 1

