Mehanizmi bakterija kojim se stanice domaćina mogu prevesti u tumorske

Orlić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:907360

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

MEHANIZMI BAKTERIJA KOJIM SE STANICE DOMAĆINA MOGU PREVESTI U TUMORSKE

BACTERIAL MECHANISMS THAT CAN TURN HOST CELLS INTO TUMOR CELLS

SEMINARSKI RAD

Lucija Orlić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. ODGOVOR NA OŠTEĆENJE DNA 2

2.1. *Helicobacter pylori* 3

2.2. *Chlamydia trachomatis* 4

2.3. Rod *Shigella* 5

2.4. *Neisseria gonorrhoeae* 6

2.5. *Listeria monocytogenes* 6

3. IZMJENA SIGNALNIH PUTEVA 8

3.1. Signalni put Wnt/β-katenin 8

3.1.1. *Helicobacter pylori* 9

3.1.2. *Samonella enterica* 10

3.1.3. *Fusobacterium nucleatum* i rak debelog crijeva 10

3.2. Signalni putevi MAPK i Akt 11

3.2.1. *Salmonella enterica* serotip Typhi i rak žučnog mjehura 12

3.2.2. *Helicobacter pylori* 12

3.2.3. *Chlamydia trachomatis* 13

4. ZAKLJUČAK 15

5. LITERATURA 16

6. SAŽETAK 18

7. SUMMARY 18

1. UVOD

Virusi su već dugo vremena poznati kao jedan od mogućih uzročnika raka, međutim, u novije vrijeme su se i neke bakterijske infekcije počele dovoditi u vezu s njegovim nastankom. Jedna od prvih bakterija čija je uloga u nastanku raka prepoznata, konkretno raka želuca, jest *Helicobacter pylori,* koja je i proglašena karcinogenom grupe 1 (Gagnaire i sur., 2017). Karcinogeni učinak prepoznat je i kod bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Chlamydia trachomatis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Bacteroides fragilis* (Lemercier, 2015). Sama kronična infekcija može pridonijeti razvoju raka, a mnoge bakterije proizvode toksine kojima utječu na stanične procese što može potaknuti stanicu na transformaciju. Toksini najčešće uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove u DNA ili ometaju popravak nastalih oštećenja (Gagnaire i sur., 2017). Genomska nestabilnost povećava vjerojatnost da će doći do aktivacije onkogena čime je organizam na korak bliže razvoju raka. Nastanak tumorskih stanica je proces od više koraka, a bakterije obično mogu pridonijeti jednom od njih ili potaknuti transformaciju već djelomično transformiranih stanica. Karakteristike tumorskih stanica uključuju sposobnost proizvodnje vlastitih faktora rasta, neosjetljivost na faktore koji inhibiraju rast, sposobnost izbjegavanja apoptoze i neograničenu sposobnost proliferacije (Hanahan i Weinberg, 2000). Uz oštećenje DNA, bakterije često utječu na razne signalne puteve u domaćinu da bi omogućile svoj opstanak u stanicama. Ti putevi obično utječu na apoptozu, staničnu proliferaciju i upalne procese i stoga mogu dovesti do umnažanja stanica koje se inače ne bi trebale dijeliti. Ovaj će rad opisati neke od mehanizama kojima bakterije ometaju odgovor na oštećenje molekule DNA i njihov utjecaj na signalne puteve u stanicama domaćina.

2. ODGOVOR NA OŠTEĆENJE DNA

Održanje genomskog integriteta veoma je bitno za organizme, što je vidljivo u raznim malignim promjenama koje mogu nastati kao rezultat genomske nestabilnosti. S obzirom da tijekom života stanice dolazi do brojnih oštećenja DNA, razvijen je niz signalnih puteva i puteva popravka da bi se ta oštećenja popravila te se umanjile njihove posljedice. Jedno od težih oštećenja DNA su dvolančani lomovi, a detektiraju se raznim proteinima, među kojima je najčešće spominjan kompleks MRN. On se sastoji od proteina Mre11, Rad50 i Nbs1 koji se vežu na mjesta lomova i aktiviraju kinazu ATM koja ima veliku ulogu u regulaciji staničnog odgovora na oštećenje DNA. Uz ATM su značajne i kinaza ATR i DNA-ovisna proteinska kinaza (DNA-PK). One fosforiliraju druge proteine koji sudjeluju u odgovoru i popravku DNA. Za odabir puta popravka važni su p53 vezujući protein 1 (53BP1) i BRCA1 (engl. *breast cancer 1*). Jedan od proteina kojeg fosforiliraju ATM, ATR ili DNA-PK je histon H2AX na Ser139, čime nastaje γH2AX koji mijenja kondenzaciju DNA u blizini loma (Ciccia i Elledge, 2011). Često se koristi u pokusima za detekciju dvolančanih lomova.

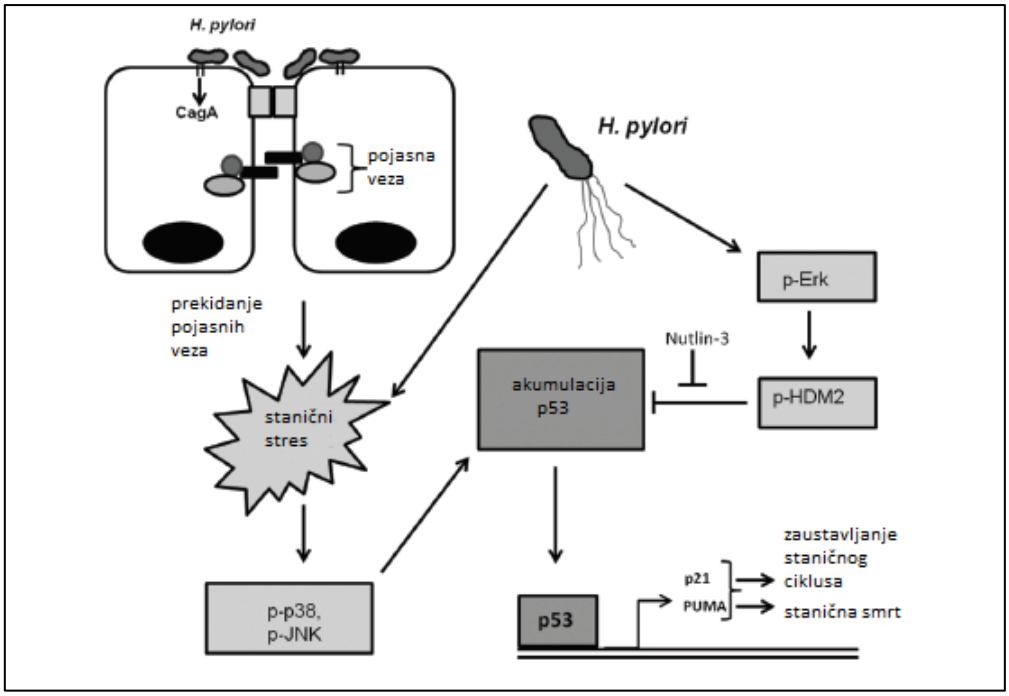
Transkripcijski aktivator p53 poznat je kao važan tumor supresor, i ima ključnu ulogu u mehanizmima koji kontroliraju stanični odgovor na razne stresne uvjete, uključujući oštećenje DNA, aktivaciju onkogena, gubitak kontakta s drugim stanicama, manjak hranjivih tvari i abnormalnu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Zaika i sur., 2015). U normalnim uvjetima, MDM2 (ubikvitin ligaza E3, u ljudskim stanicama HDM2) konstantno ubikvitinira p53 i degradira. Vezanjem MDM2 za transaktivacijsku domenu na N-terminusu p53, dodatno se sprječava interakcija p53 s transkripcijskim aparatom, a uz to ga može i translocirati u citosol i time maknuti iz područja njegova djelovanja. Sam gen *mdm2* se transkribira pod utjecajem p53, stoga između ta dva proteina postoji negativna povratna sprega. U uvjetima stresa, kao što su lomovi DNA i izloženost UV zračenju, p53 se stabilizira kroz niz fosforilacija i MDM2 i njega samoga. Kao odgovor na oštećenje DNA, prvu fosforilaciju p53 na Ser15 izvršava kinaza ATM, dok kod odgovora na UV zračenje Ser15 fosforilira kinaza ATR. Fosforilacija Ser15 potiče niz daljnjih posttranslacijskih modifikacija koji doprinose stabilizaciji i aktivaciji p53. Modifikacije MDM2 inhibiraju njegovu sposobnost da veže i degradira p53 (Meek, 2004). Stabilizacija p53 omogućuje transkripcijsku kontrolu niza gena čiji produkti zaustavljaju stanični ciklus, potiču apoptozu i inhibiraju određene metaboličke puteve. Važnost njegove uloge vidljiva je u činjenici da je gen koji kodira p53, TP53, mutiran u više od 50% slučajeva raka kod ljudi (Gagnaire i sur., 2017).

Odgovor na oštećenje DNA usporava stanični ciklus te uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa, senescenciju (starenje) ili smrt stanice. Usporavanjem staničnog ciklusa dobiva se vrijeme potrebno za popravak oštećenja, a ukoliko su ona prevelika dioba stanica se zaustavlja da bi se izbjegao nastanak tumora. Stoga bakterije koje utječu na regulaciju odgovora i sprječavaju popravak oštećenja mogu pridonijeti nastanku tumora.

2.1. *Helicobacter pylori*

H. pylori je Gram-negativna bakterija za koju se procjenjuje da nastanjuje probavni sustav 50% stanovništva svijeta. Dok 80% ne razvije nikakve simptome, ostalih 20% razvije kronični gastritis. Zaraza *H. pylori* povezuje se s nastankom raka želuca kroz kroničnu infekciju i upalu želučane sluznice (Lemercier, 2015). Međutim, ta je povezanost izražena kod manjeg dijela zaraženih, što upućuje na postojanje raznih faktori koju utječu na razvoj bolesti, uključujući okolišne faktore i soj bakterije (Gagnaire i sur., 2017).

Jedan od njih je faktor virulencije CagA (engl. *cytotoxin-associated gene A*). On je kodiran genom koji se nalazi u otoku patogenosti *cag* (engl. cag *pathogenicity island*, *cag*-PAI), koji kodira i sustav sekrecije tipa 4 nužan za unos bakterijskih proteina u stanicu domaćina (Bhardwaj i sur., 2015). CagA odgađa profazu i metafazu, zbog čega dolazi do pogrešne orijentacije diobenog vretena te nastaju anomalije u segregaciji kromosoma i genomska nestabilnost (Umeda i sur., 2009). Infekcija *cag*-PAI-pozitivnom *H. pylori* uzrokuje pojavu dvolančanih lomova DNA što aktivira put popravka DNA. Osim lomova, smanjuje se količina E-kadherina u stanici i prekidaju pojasne veze (lat. *zonula adherens*) blizu kojih se *H. pylori* preferentno veže. CagA sprječava apoptozu stanice tako što inducira razgradnju p53, što je direktno povezano s kancerogenim potencijalom sojeva *H. pylori*. CagA preko kinaza Erk i Akt potiče pojačanu fosforilaciju proteina HDM2 koji inhibira p53 (Slika 1., Slika 2.a). *H. pylori* može pojačati ekspresiju Δ133p53 izoforme čime se inhibira aktivnost normalnog p53, potiče preživljavanje stanice i povećava vjerojatnost razvoja raka (Bhardwaj i sur., 2015; Gagnaire i sur., 2017).



Slika 1. *H. pylori* sprječava apoptozu tako što inducira razgradnju p53. (Preuzeto i prilagođeno iz Bhardwaj i sur., 2015.)

2.2. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiae su Gram-negativne obligatne unutarstanične bakterije koje uzrokuju niz bolesti u ljudi. Uzrokuju stvaranje ROS-ova i time dvolančanih lomova DNA, a inhibiraju apoptozu. Najpoznatija je *C. trachomatis*, koja uzrokuje spolno prenosivu bolest koja je često asimptomatska, a neliječenje može imati ozbiljne posljedice. Kronična infekcija *C. trachomatis* povezuje se s pojavom raka cerviksa i jajnika (Chumduri i sur., 2013; Gagnaire i sur., 2017). *C. trachomatis* ima dvofazni životni ciklus; metabolički neaktivna elementarna tjelešca sudjeluju u prijenosu infekcije na nove domaćinske stanice, i retikularna tjelešca koja se nalaze u inkluzijama u domaćinskim stanicama te su metabolički aktivna i repliciraju se (Chumduri i sur., 2013). Elementarna tjelešca se vežu na receptorske tirozin kinaze koje aktiviraju MAPK i PI3K signalne puteve.

Prilikom infekcije dolazi do epigenetičkih promjena poput modifikacije histona i stvaranja kromatinskih fokusa vezanih uz senescenciju, što može uzrokovati promjene u genskoj aktivnosti i stvoriti mogućnost transformacije stanica. Pod utjecajem ROS-ova nastaju dvolančani lomovi ali dolazi do inhibicije vezanja Mre11, ATM i 53BP1 koji sudjeluju u njihovom popravku. Da bi omogućila svoj opstanak u stanici, *C. trachomatis* aktivira ubikvitin

ligazu MDM2 preko signalnog puta PI3K i time uzrokuje ubikvitinaciju i proteosomalnu razgradnju tumor supresora p53 (Slika 2.a). Nestanak p53 aktivira put pentoza fosfata, čime dolazi do proizvodnje metabolita potrebnih za njen rast (Elwell i sur., 2016; Lemercier, 2015). Odsutnost p53 pomaže blokiranju apoptoze, a dolazi i do odjeljivanja pro-apoptotskih proteina PKCδ ili BAD u inkluzijsku membranu. Blokira se kaspaza 8 i eksprimiraju se ili stabiliziraju anti-apoptotski proteini. Nakon izlječenja infekcije, stanice koje su bile zaražene su fiziološki promijenjene; smanjena je aktivnost p53 i stanice su otpornije na apoptozu. Ove promjene potencijalno mogu dovesti do transformacije stanica i posljedično nastanka tumora (Elwell i sur., 2016).

2.3. Rod *Shigella*

Rod *Shigella* je skupina Gram-negativnih, fakultativno anaerobnih bakterija koje inficiraju probavni trakt i uzrokuju šigelozu tj. bacilarnu dizenteriju. Dijele se na 4 serološka tipa: *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* i *S. sonnei*. Najčešće su *S. flexneri* i *S. sonnei*. *Shigellae* su unutarstanični patogeni, a svoj ulazak potiču pomoću sekrecijskog sustava tipa 3 koji čini strukturu nalik na iglu. Nakon ulaska u stanicu izlaze iz ulazne vakuole i slobodno se kreću po stanici (Killackey i sur., 2016).

U inficiranih stanica inducira se aktivacija ATM i fosforilacija H2AX. Način na koji *Shigella* uzrokuje oštećenje DNA nije poznat. Unatoč oštećenjima, u domaćinskim stanicama ne dolazi do stabilizacije p53 ni apoptoze (Lemercier, 2015). Preživljavanje domaćinske stanice u ranoj fazi potiče fosfataza inozitol fosfata D (IpgD). IpgD povisuje razinu fosfatidilinozitol-5-fosfata (PI5P) što aktivira signalni put PI3K/Akt i time fosforilaciju MDM2 zbog čega dolazi do degradacije p53. U kasnoj fazi infekcije faktor virulencije VirA promovira proteolizu kalpastatina. Kalpastatin je inhibitor kalpaina, obitelji staničnih proteaza (Killackey i sur., 2016; Zaika i sur., 2015). Neinhibirani kalpaini potom uzrokuju degradaciju p53 (Slika 2.a). Osim VirA i IpgD, pokazano je da u epitelnim stanicama protein OspC3 djeluje kao antagonist piroptoze potaknute kaspazom 4 (Killackey i sur., 2016). Unatoč tome što stanice mogu popraviti oštećenja DNA uzrokovana infekcijom, pritom često dolazi do mutacija zbog čega se smatra da bi to moglo pridonijeti transformaciji stanica u tumorske (Gagnaire i sur., 2017).

2.4. *Neisseria gonorrhoeae*

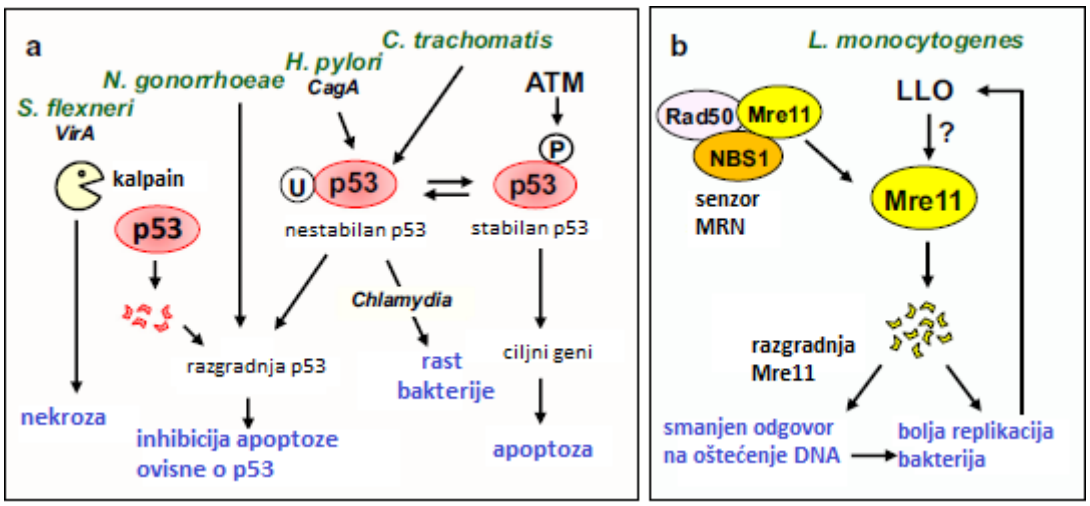
Poput već navedenih primjera, *N. gonorrhoeae* prilikom infekcije također uzrokuje smanjenje razine p53 (Slika 2.a). To je Gram-negativna bakterija koja je uzročnik spolno prenosive bolesti gonoreje (gonokokne infekcije). Bolest je često dugotrajna i asimptomatska. Prilikom infekcije dolazi do stvaranja fokusa sličnih onima nastalim nakon ionizirajućeg zračenja (detekcija γH2AX i 53BP1). U *in vitro* pokusima je pokazano da uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove DNA. Uslijed infekcije je primijećeno i zaustavljanje stanica u fazi G1 staničnog ciklusa radi popravka DNA. To je posljedica povećane ekspresije inhibitora ciklin-ovisnih kinaza, p21 i p27, i njihove lokalizacije u jezgri. Ovi proteini imaju ulogu u popravku oštećenja DNA i regulaciji staničnog ciklusa. U prisutnosti agensa koji oštećuju DNA njihova je ekspresija neovisna o p53 što je i vidljivo u činjenici da je za razliku od njih, razina p53 u infekciji smanjena (Vielfort i sur., 2013). Utišavanje p53 povezano je s inhibicijom njegove transkripcije, ali mehanizam još nije potpuno razjašnjen. Dugotrajna gonokokna infekcija stvara pritisak na mašineriju popravka DNA zbog povećanog oštećivanja, i time stvara predispoziciju za maligne promjene (Lemercier, 2015; Zaika i sur., 2015).

2.5. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je fakultativna unutarstanična bakterija koja je uzročnik listerioze. Nakon ulaska u domaćinsku stanicu izlazi iz vakuole pomoću listeriolizina O (LLO) i dijeli se u citoplazmi. LLO je toksin koji formira pore u membranama (Samba-Louaka i sur., 2014).

Pri niskom multiplicitetu infekcije (manjem od 1) nastaju dvolančani lomovi DNA i fokusi γH2AX. Oštećenja nastaju neovisno o LLO, a nisu ni posljedica ROS-ova čije stvaranje LLO inhibira. LLO sprječava lokalizaciju oksidaze NADPH u fagosomima i time njenu aktivaciju. Stoga se smatra da *L. monocytogenes* uzrokuje oštećenja nekim drugim mehanizmom. Odgovor na oštećenje DNA je atipičan jer je za fosforilaciju H2AX odgovorna DNA-ovisna proteinska kinaza (DNA-PK) umjesto ATM ili ATR (Gagnaire i sur., 2017; Lemercier, 2015). Utišavanje odgovora na oštećenje DNA je nužno za produktivnu infekciju *L. monocytogenes*. Za razliku od prethodno navedenih primjera, ona ga ne utišava smanjenjem količine tumor supresora p53, već degradacijom Mre11, komponente signalnog kompleksa MRN (Slika 2.b). Odgovornost za to snosi LLO koji njegovu degradaciju inducira preko aspartil proteaze ovisne o kalciju. Razina Mre11 ostaje niska i 24h nakon uklanjanja LLO (Samba-Louaka i sur., 2014). Deacetilacijom histona pomoću sirtuin 2 deacetilaze *L.*

monocytogenes uzrokuje represiju jednog seta domaćinskih gena, što je nužno za uspješnu infekciju (Eskandarian i sur., 2013). Sve ove promjene doprinose povećanju onkogenog potencijala inficiranih stanica.

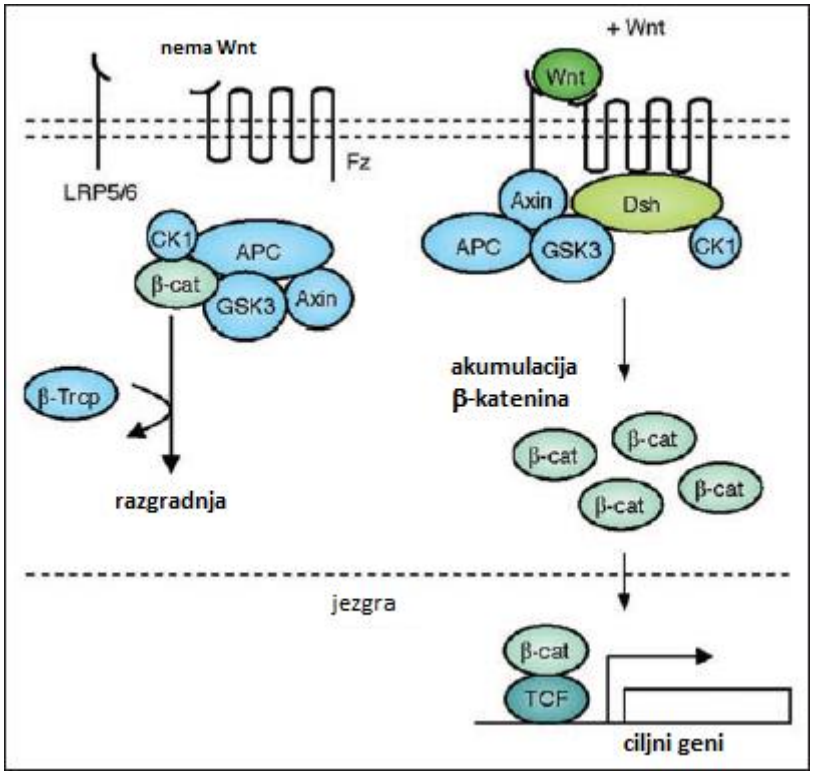


Slika 2. Inhibicija odgovora na oštećenje DNA: *S. flexneri*, *N. gonorrhoeae*, *H. pylori* i *C.trachomatis* uzrokuju razgradnju tumor supresora p53 (a), a *L. monocytogenes* uzrokuje razgradnju proteina Mre 11 (b). (Preuzeto i prilagođeno iz Lemercier, 2015.)

3. IZMJENA SIGNALNIH PUTEVA

3.1. Signalni put Wnt/β-katenin

Signalni put Wnt/β-katenin, poznat i kao kanonski put Wnt, regulira gene važne za staničnu diferencijaciju, organogenezu i embriogenezu, uključujući razne onkogene. Glavna značajka mu je nakupljanje β-katenina u jezgri. Bez signalnog proteina Wnt, kompleks za uništenje β-katenina razgrađuje citoplazmatski β-katenin. Kompleks uključuje protein APC (engl. *adenomatosis polyposis coli*), proteinsku fosfatazu 2A (PP2A), kinazu glikogen sintaze 3 (GSK3) i kasein kinazu 1α (CK1α). CK i GSK3 fosforiliraju β-katenin čime ga označavaju za ubikvitinaciju i proteosomalnu degradaciju. Vezanje proteina Wnt za svoj receptorski kompleks potiče niz događaja koji poremete kompleks APC/aksin/GSK3. Dolazi do aktivacije fosfoproteina Dsh koji inhibira aktivnost GSK3 i aktivira procese koji sprječavaju degradaciju β-katenina te dovode do njegove stabilizacije i nakupljanja u citoplazmi. β-katenin se potom slabo poznatim mehanizmom translocira u jezgru, gdje djeluje kao transkripcijski koaktivator. Njegovi najbolje poznati vezujući partneri su iz obitelji DNA-vezujućih transkripcijskih faktora LEF/TCF. Kompleks β-katenina i LEF/TCF se veže za promotor ciljnih gena (Slika 3.). Poremećena regulacija signalnog puta Wnt/β-katenin može dovesti do aktivacije gena uključenih u onkogenezu (npr. Myc i ciklin D1), pa infekcija bakterijama koje utječu na ovaj put može pridonijeti riziku nastanka tumora (Komiya i Habas, 2008).



Slika 3. Protein Wnt inhibira kompleks APC/aksin/GSK3 pa dolazi do akumulacije β-katenina u citoplazmi i njegove translokacije u jezgru. β-katenin stvara kompleks s transkripcijskim faktorom TCF što aktivira transkripciju ciljnih gena. (Preuzeto i prilagođeno iz Komiya i Habas, 2008.)

3.1.1. *Helicobacter pylori*

Uz degradaciju tumor supresora p53, *H. pylori* inhibira apoptozu i potiče proliferaciju epitelnih stanica želuca aktivacijom signalnog puta Wnt/β-katenin pomoću raznih faktora. Osim toga inhibira tumor supresore Runx3 i TFF1 koji inače inhibiraju signalni put Wnt/β-katenin. CagA pozitivna *H. pylori* inducira fosforilaciju i aktivaciju c-Met (poznat i kao tirozinska proteinska kinaza Met ili receptor faktora rasta hepatocita HGFR) te proliferaciju epitelnih stanica želuca. Aktivacijom c-Met se aktivira signalni put PI3K/Akt koji deaktivira kinazu glikogen sintaze 3β (GSK3β) pa je spriječena degradacija β-katenina (Song i sur., 2015). Vezanjem CagA za E-kadherin sprječava se stvaranje kompleksa E-kadherin/β-katenin i dolazi do narušavanja veza između stanica (Jones i sur., 2010). β-katenin se nakuplja u citoplazmi i potom translocira u jezgru. Ovaj signalni put promovira proliferaciju stanica i sprječava apoptozu. Drugi mehanizam kojim se aktivira signalni put β-katenin ovisan je o faktorima virulencije VacA i OipA (Song i sur., 2015).

VacA se nalazi u većini sojeva *H. pylori*, a uzrokuje pojavu velikih vakuola u domaćinskim stanicama i potiče apoptozu. VacA može oligomerizirati u membranama tvoreći kanale selektivne za anione. Utječe na razne signalne puteve u stanici, što uključuje aktivaciju puteva p38 i ERK. Za onkogeni učinak značajna je aktivacija signalnog puta β-katenin (Jones i sur., 2010). Struktura VacA varira u različitim sojevima *H. pylori*, što se povezuje s njihovom vjerojatnošću da će izazvati određeni klinički ishod. Prisutne su varijacije u signalnoj (s1 i s2), srednjoj (m1 i m2) i intermedijarnoj regiji (i1, i2 i i3). Kombinacija s1/m1 pokazala je najveću citotoksičnost *in vitro* te se smatra da daje povećani rizik za razvoj čira i/ili raka želuca. Nije pronađena povezanost između određenih kliničkih ishoda i varijacija u i regiji (Yamaoka i Graham, 2014). VacA prilikom infekcije uzrokuje aktivaciju receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). On aktivira signalni put PI3K/Akt koji potakne akumulaciju β-katenina. EGFR također može aktivirati faktor virulencije OipA. β-katenin se u jezgri sparuje s TCF (engl. *T cell factor*) koji inicira transkripciju gena za stanični rast što može dovesti do transformacije stanica (Gagnaire i sur., 2017; Song i sur., 2015).

3.1.2. *Samonella enterica*

S. enterica je Gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja uzrokuje bolesti vezane uz probavni sustav kod ljudi i životinja. AvrA je multi-funkcionalni protein koji utječe na signalne puteve eukariotskih stanica koji koriste fosforilaciju, ubikvitinaciju i acetilaciju. Unosi se u domaćinske stanice pomoću sustava sekrecije tipa 3 i tamo aktivira signalni put Wnt/β-katenin. Pritom se povećava ekspresija proteina Wnt, modificira se β-katenin i povećava njegova ukupna ekspresija. AvrA također uzrokuje pojavu markera matičnih stanica u epitelnim stanicama crijeva (npr. p-β-katenin), regulira ubikvitinaciju β-katenina i stabilizira ga. Infekcija povećava broj matičnih i proliferirajućih stanica u crijevu. Istraživanjima je pokazano da aktivacija signalnog puta Wnt/β-katenin započinje neoplastične procese koji mogu dovesti do adenoma crijeva (Liu i sur., 2010).

3.1.3. *Fusobacterium nucleatum* i rak debelog crijeva

F. nucleatum je oportunistički anaerobni komenzal u usnoj šupljini. Povezuje se s periodontalnim bolestima ali i ekstraoralnim infekcijama. Jedan je od najčešćih uzročnika intrauterinih infekcija povezanih s komplikacijama u trudnoći. Također se povezuje s rakom debelog crijeva. *F. nucleatum* se veže i ulazi u stanice epitela i endotela pomoću adhezina FadA. FadA se eksprimira na površini bakterije i visoko je konzerviran. Veže se na E-kadherin

normalnih i tumorskih stanica debelog crijeva čime narušava kompleks E-kadherin/β-katenin i aktivira signalni put β-katenin. Poveća se ekspresija transkripcijskih faktora, onkogena, Wnt i upalnih gena te se stimulira rast tumorskih stanica debelog crijeva.

Vezno mjesto na E-kadherinu za FadA sastoji se od 11 aminokiselina, a sintetički peptid napravljen prema toj regiji sprječava rast tumorskih stanica induciranih pomoću FadA te onkogene i upalne procese. Za aktivaciju signalnog puta Wnt i onkogena dovoljno je samo vezanje FadA na tumorske stanice debelog crijeva, dok je za aktivaciju upalnih gena potreban unos bakterije u stanicu. Interakcija FadA i E-kadherina ima glavnu ulogu u poticanju razvoja raka debelog crijeva, a putevi neovisni o FadA imaju manji utjecaj. *F. nucleatum* bitno stimulira proliferaciju samo onih tumorskih stanica koje eksprimiraju E-kadherin te se gubitak ekspresije E-kadherina povezuje s uznapredovalim rakom debelog crijeva i lošom prognozom za pacijenta. Pokazano je da upala ima ključnu ulogu u onkogenezi raka debelog crijeva, a *F. nucleatum* infekcijom stvara za to pogodan proupalni mikrookoliš. Značajno je da je sam FadA sposoban stimulirati istu razinu upalnog odgovora kao i *F. nucleatum*. Razina FadA je 10 do 100 puta veća u tkivu adenoma ili adenokarcinoma debelog crijeva pacijenata nego u normalnom tkivu pojedinaca. Stoga bi povećana kolonizacija normalnih tkiva bakterijom mogla stvoriti predispoziciju da će domaćin razviti adenom ili adenokarcinom. Karcinogeneza bi se ubrzala nakon što bi došlo do mutacije što podržava činjenica da je ekspresija FadA povećana samo u tumorskim tkivima (Rubinstein i sur., 2013).

3.2. Signalni putevi MAPK i Akt

Proteinska kinaza aktivirana mitogenom (MAPK) je serinska i treoninska kinaza koja aktivira kinaze Ras i Raf. Signalni put MAPK potiče transkripciju gena čiji su produkti vezani uz proliferaciju, rast, upalni odgovor i apoptozu. Sastoji se od više signalnih kasakada od kojih su najpoznatiji signalni putevi ERK, JNK i p38. Kinaza Akt pokreće više signalnih puteva (npr. mTOR), a aktivira se signalnim putem PI3K preko proteinske kinaze PDK1. Kontrolira proliferaciju i apoptozu. Razni bakterijski proteini aktiviraju signalni put Akt da bi omogućili opstanak bakterije u stanici. STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription*) regulira stanični rast, apoptozu, angiogenezu i migraciju stanica, a često je aktiviran u ljudskim tumorima (Gagnaire i sur., 2017).

3.2.1. *Salmonella enterica* serotip Typhi i rak žučnog mjehura

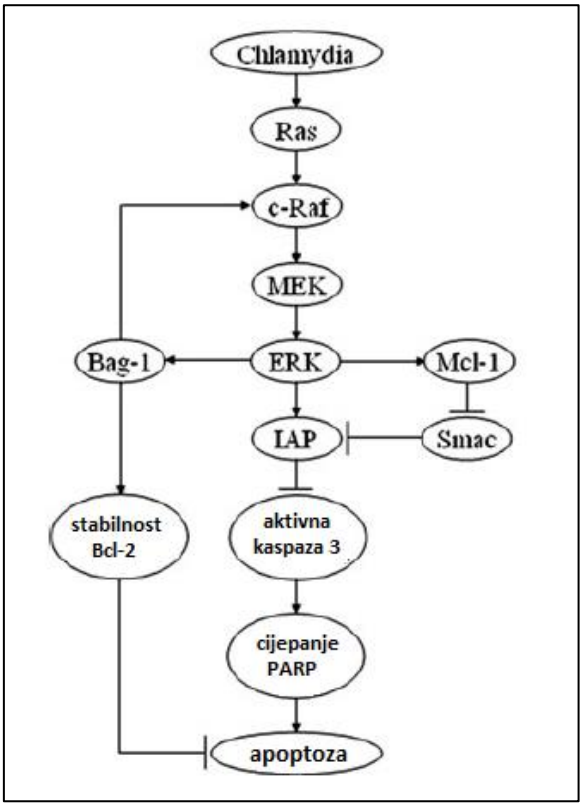
S. Typhi endemična je u Indiji i Pakistanu i uzrokuje tifusnu groznicu. Istraživanja su pokazala da rak žučnog mjehura u Indiji ima jedinstvene mutacije i sadrži DNA *S*. Typhi. Kronična infekcija sa *S*. Typhi je značajni faktor rizika za nastanak raka žučnog mjehura. *Salmonella enterica* tijekom infekcije manipulira signalnim putevima Akt i MAPK što potiče transformaciju stanica. Pomoću sekrecijskog sustava tipa 3 unose se proteini koji aktiviraju MAPK i Akt, a njihova je aktivacija od velike važnosti za inicijaciju i održavanje transformacije. *S.* Typhimurium može izravno potaknuti staničnu transformaciju u organoidima žučnog mjehura i u mišjim embrionalnim fibroblastima i nadodati pred-transformirajuće mutacije. Takve mutacije su nađene i u uzorcima raka žučnog mjehura iz Indije, uz DNA *S*. Typhi. Unatoč detekciji DNA *S*. Typhi u većini tkiva tumora iz Indije, sama se bakterija rijetko pronalazi u tumorskim stanicama. Iz toga se može zaključiti da *S*. Typhi može potaknuti transformaciju, ali nije nužna za održavanje takvog stanja. Važno je napomenuti da samo dio pojedinaca s kroničnom infekcijom razvije rak, stoga je moguće da *S*. Typhi tek pridonosi jednom koraku u transformaciji stanica (Scanu i sur., 2015).

3.2.2. *Helicobacter pylori*

Faktor virulencije CagA pokazao se kao najznačajniji protein za virulenciju i onkogeni učinak *H. pylori*. Ima utjecaj na širok broj staničnih funkcija što dokazuje i činjenica da uzrokuje aktivaciju velikog broja transkripcijskih faktora. Uz već spomenute utjecaje na tumor supresor p53 i signalni put β-katenin, CagA ima ulogu i u aktivaciji signalnih puteva MAPK, STAT3 i Akt. Aktivacija puta MAPK odvija se kroz interakciju CagA s proteinom Grb2 (engl. *growth factor receptor bound 2*), vjerojatno vezanjem CagA na domene SH2 proteina Grb2. Potom Grb2 veže protein SoS što potakne stvaranje kompleksa Ras-GTP i aktivira put Raf→MEK→ERK. Tim putem se poveća aktivacija transkripcijskih faktora uključenih u staničnu proliferaciju i eksprimiraju proteini koji promiču preživljavanje stanice. CagA utječe i na aktivnost puta transduktora signala i aktivatora transkripcije 3 (STAT3) koji također inducira proliferaciju. Fosforiliranost CagA utječe na odabir potaknutog signalnog puta; MAPK je ovisan o fosforiliranom, a STAT3 o nefosforiliranom CagA. Povrh toga, interakcija nefosforiliranog CagA s c-Met potiče aktivaciju signalnog puta Akt (Jones i sur., 2010). Poticanje preživljavanja stanica i njihova povećana proliferacija koje ovi signalni putevi potiču, jedan su od indikatora transformacije stanica. Ovakve promjene nastale u već djelomično transformiranim stanicama mogu dovesti do nastanka tumora.

3.2.3. *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis može povećati otpornost stanice domaćina na apoptozu degradacijom pro-apoptotskih proteina i regulacijom signalnih puteva koji uključuju signalni put MAPK. Regulacija apoptoze je važan mehanizam kojim *C. trachomatis* izbjegava imuni sustav domaćina i omogućava infekciju. Signalizacija MAPK se aktivira prilikom vezanja *C. trachomatis* u obliku elementarnog tjelešca za receptor faktora rasta fibroblasta (FGFR) koji se potom unosi u stanicu zajedno s elementarnim tjelešcem (Elwell i sur., 2016; Kun i sur., 2013). Aktivacija MAPK prevladava utjecaj apoptotskih signala povećanjem razine anti-apoptotskih proteina poput Mcl-1 i Bcl-2. Bcl-2 razgrađuje pro-apoptotske proteine konzerviranom domenom. Protein Bag-1 (engl. *Bcl-2 associated athanogene*) je regulator apoptoze i štiti stanicu od širokog raspona apoptotskih stimulusa. Regulacija mu je često poremećena u tumorima. Inhibira apoptozu sam ili u suradnji s Bcl-2, a njegova pojačana ekspresija je dovoljna za zaštitu stanice od smrti (Slika 4.). Kada je signalni put MAPK blokiran kemijskim inhibitorima, smanjena je ekspresija Bag-1 iz čega se može zaključiti da je taj put odgovoran za njegovu regulaciju (Kun i sur., 2013). Inhibicija apoptoze omogućava stanicama s oštećenjima i mutacijama u DNA da prežive zbog čega ima onkogeni potencijal.



Slika 4. *Chlamydia* aktivira signalni put MAPK koji inhibira apoptozu putem proteina Bag-1 i Bcl-2. (Preuzeto i prilagođeno iz Kun i sur., 2013.)

4. ZAKLJUČAK

Patogene bakterije prilikom infekcije koriste razne mehanizme da bi uspješno ostvarile infekciju i svoj opstanak te da bi se zaštitile od imunološkog sustava domaćina. Pritom se može dogoditi da olakšaju transformaciju stanica u tumorske u tkivima koja inficiraju. Veći rizik donose kronične infekcije jer su tkiva duže izložena takvom utjecaju.

Mehanizmi koji doprinose razvoju raka uključuju oštećenje molekule DNA i ometanje njenog popravka, promijenjenu regulaciju signalnih puteva i utišavanje imunološkog odgovora. Kao posljedica infekcije u domaćinskim stanicama može biti promijenjena transkripcija gena, uključujući i onkogene, pod utjecajem transkripcijskih faktora aktiviranih infekcijom i promijenjene modifikacije histona. Potiče se stanična proliferacija i preživljavanje, a inhibira apoptoza. Kako su mnoge od opisanih bakterija unutarstanični paraziti, ove promjene omogućavaju njihov opstanak unutar stanice. Neke bakterije dovode do narušavanja veza između stanica. Čak i nakon infekcija u domaćinskim stanicama mogu ostati oštećenja u molekuli DNA, a neke stanice zadržavaju izmijenjenu regulaciju signalnih puteva.

Važno je napomenuti da infekcija ne može samostalno izazvati rak, nego je potreban i niz koraka neovisnih o infekciji. Za pretpostaviti je da bakterijama nije svrha uzrokovati maligne promjene, što potvrđuje činjenica da je malen udio onih koji uslijed kronične infekcije obole od raka. Saznanja o mehanizmima kojima bakterije utječu na stanice domaćina dovode do povezivanja sve većeg broja vrsta bakterija s razvojem tumora. Potrebno je još mnogo istraživanja da bi se u potpunosti razumio utjecaj patogenih bakterija na domaćina. Razumijevanje molekularnih mehanizama nužno je za razvoj antibiotika i liječenje infekcija, kao i prevenciju težih posljedica.

5. LITERATURA

Bhardwaj, V., Noto, J.M., Wei, J., Andl, C., El-Rifai, W., Peek, R.M., i Zaika, A.I. (2015). Helicobacter pylori bacteria alter the p53 stress response via ERK-HDM2 pathway. Oncotarget *6*, 1531–1543.

Chumduri, C., Gurumurthy, R.K., Zadora, P.K., Mi, Y., i Meyer, T.F. (2013). Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. Cell Host Microbe *13*, 746–758.

Ciccia, A., i Elledge, S.J. (2011). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Mol. Cell *40*, 179–204.

Elwell, C., Mirrashidi, K., i Engel, J. (2016). Chlamydia cell biology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol. *14*, 385–400.

Eskandarian, H.A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Cossart, P., i Hamon, M.A. (2013). A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. Science *341*, 1238858.

Gagnaire, A., Nadel, B., Raoult, D., Neefjes, J., i Gorvel, J.-P. (2017). Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. Nat. Rev. Microbiol. *15*, 109-128.

Hanahan, D., i Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57–70.

Jones, K.R., Whitmire, J.M., i Merrell, D.S. (2010). A tale of two toxins: Helicobacter pylori CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. Front. Microbiol. *1*, 1–17.

Killackey, S.A., Sorbara, M.T., i Girardin, S.E. (2016). Cellular Aspects of Shigella Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6*, 38.

Komiya, Y., i Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. Organogenesis *4*, 68–75.

Kun, D., Xiang-Lin, C., Ming, Z., i Qi, L. (2013). Chlamydia inhibit host cell apoptosis by inducing Bag-1 via the MAPK/ERK survival pathway. Apoptosis *18*, 1083–1092.

Lemercier, C. (2015). When our genome is targeted by pathogenic bacteria. Cell. Mol. Life

Sci. *72*, 2665–2676.

Liu, X., Lu, R., Wu, S., i Sun, J. (2010). Salmonella regulation of intestinal stem cells through the Wnt/β-catenin pathway. FEBS Lett. *584*, 911–916.

Meek, D.W. (2004). The p53 response to DNA damage. DNA Repair (Amst). *3*, 1049–1056.

Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., i Han, Y.W. (2013). Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/β-Catenin Signaling via its FadA Adhesin. Cell Host Microbe *14*, 195–206.

Samba-Louaka, A., Pereira, J.M., Nahori, M.A., Villiers, V., Deriano, L., Hamon, M.A., i Cossart, P. (2014). Listeria monocytogenes dampens the DNA damage response. PLoS Pathog *10*, e1004470.

Scanu, T., Spaapen, R.M., Bakker, J.M., Pratap, C.B., Wu, L., Hofland, I., Broeks, A., Shukla, V.K., Kumar, M., Janssen, H., Song, J., Neefjes-Borst, E.A., te Riele, H., Holden, D.W., Nath, G., i Neefjes, J. (2015). Salmonella Manipulation of Host Signaling Pathways Provokes Cellular Transformation Associated with Gallbladder Carcinoma. Cell Host Microbe *17*, 763–774.

Song, X., Xin, N., Wang, W., i Zhao, C. (2015). Wnt/β-catenin, an oncogenic pathway targeted by H. pylori in gastric carcinogenesis. Oncotarget *6*, 35579–35588.

Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Ohba, Y., Takahashi, M., i Hatakeyama, M. (2009). Helicobacter pylori CagA causes mitotic impairment and induces chromosomal instability. J. Biol. Chem. *284*, 22166–22172.

Vielfort, K., Söderholm, N., Weyler, L., Vare, D., Löfmark, S., i Aro, H. (2013). Neisseria gonorrhoeae infection causes DNA damage and affects the expression of p21, p27 and p53 in non-tumor epithelial cells. J. Cell Sci. *126*, 339–347.

Yamaoka, Y., i Graham, D.Y. (2014). Helicobacter pylori virulence and cancer pathogenesis. Future Oncol. *10*, 1487–1500.

Zaika, A.I., Wei, J., Noto, J.M., i Peek, R.M. (2015). Microbial Regulation of p53 Tumor Suppressor. PLoS Pathog. *11*, 1–11.

6. SAŽETAK

Sve je veći broj istraživanja koja dovode u vezu određene bakterijske vrste i rizik od nastanka raka. Prilikom infekcije, da bi preživjele i razmnožile se, patogene bakterije potiču niz promjena u domaćinskim stanicama. Pritom često dolazi do oštećenja molekule DNA. Različiti faktori virulencije onemogućuju cjelovit odgovor stanice na oštećenje DNA; većina bakterija, poput *H. pylori*, smanjuje razinu tumor supresora p53, a *Listeria monocytogenes* uzrokuje degradaciju proteina Mre11. Bakterije također mogu utjecati na signalne puteve stanice. *H. pylori*, *Salmonella enterica* i *Fusobacterium nucleatum* aktiviraju signalni put Wnt/β-katenin koji može dovesti do aktivacije gena uključenih u onkogenezu. Signalni putevi MAPK i Akt kontroliraju proliferaciju i apoptozu, a na njihovu regulaciju utječu *S. enterica*, *H. pylori* i *C. trachomatis*. Ovi mehanizmi doprinose razvoju raka jer mogu dovesti stanice domaćina korak bliže transformaciji. Veći je rizik kod kroničnih infekcija jer je organizam izložen takvom utjecaju kroz duži vremenski period.

7. SUMMARY

A growing number of research is finding a connection between certain species of bacteria and the risk of cancer development. During infection, to survive and proliferate, pathogenic bacteria induce a series of changes in host cells. Simultaneously, DNA damage often occurs. Various virulence factors can disrupt DNA damage response; most bacteria, such as *H. pylori*, downregulate tumor suppressor p53, while *Listeria monocytogenes* causes Mre11 degradation. Bacteria can also affect cell signaling. *H. pylori*, *Salmonella enterica* and *Fusobacterium nucleatum* activate Wnt/β-catenin signal pathway which can lead to activation of genes involved in oncogenesis. MAPK and Akt signal pathways control cell proliferation and apoptosis, and they are regulated by *S. enterica*, *H. pylori* and *C. trachomatis*. These mechanisms contribute to cancer development because they can bring host cells one step closer to transformation. Chronic infections bring greater risk because the organism is exposed to such influence over a longer period of time.