

Ruoansulatuselimistön bakteerien vaikutukset kasvainten kehittymiseen

Valtteri Leppilampi

LuK-tutkielma
Biologian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
Kesäkuu 2020

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	3
2. Bakteerien aiheuttama tulehdusreaktio ja kasvaimet	4
3.1 <i>E. coli</i>	5
3.2 CLB-saareke	6
3.3 Colibaktiini ja sen vaikutukset.....	6
3.4 Colibaktiinin aiheuttamat mutaatiot.....	7
3.5 Colibaktiinin aiheuttama seneskenssi ja kasvutekijät.....	8
3.6 CNF-proteiini	9
4.1 <i>Helicobacter Pylori</i>	10
4.2 VacA-proteiini.....	11
4.3 Ulkokalvon proteiinit.....	12
4.4 Cag-patogeeninen saareke.....	12
4.5 Peptidoglykaanit.....	13
4.6 <i>H.pylori</i> ja β -cateniini	14
4.7 <i>H.pylori</i> Yhteenveto ja yhteys paksusuolen syöpään	15
5.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	16
5.2 <i>F.nucleatumin</i> virulenssitekijät	16
5.3 <i>F. nucleatum</i> ja immuunivaste	17
6.1 <i>Bacterioides fragilis</i>	18
6.2 BFT-toksiini	19
6.3 <i>B. fragilis</i> ja tulehdusreaktio	19
6.4 <i>B.fragilis</i> ja pitkä ei-koodava RNA	20
7. Yhteenveto	20
Viittaukset	22

1. Johdanto

Ihmisen elimistössä elää valtava määrä erilaisia bakteereja, joista osa on hyödyllisiä symbiontteja ja toiset ovat taas patogeenejä. Ihmisen elimistön bakteerien koostumus eli mikrobiomi vaikuttaa suuresti myös ihmisen terveyteen. Ihmisen mikrobiomin genomin koko yhdistettynä on yli 100-kertainen meidän omaan genomiimme verrattuna, joten sen metaboliolla on myös väistämättä merkitystä ihmisen terveyteen. (Schwabe & Jobin, 2013) Tästä mikrobiomista yli 99 % sijaitsee meidän ruoansulatuselimistössämme ja tämän vuoksi sen roolia ihmisen terveyteen on tutkittu kaikista eniten. (Schwabe & Jobin, 2013) Muita ihmisen mikrobiomeja on esimerkiksi iho. Yksi sairaus mihin ruoansulatuselimistön mikrobiomi yhä kasvavissa määrin yhdistetään, on erilaiset ruoansulatuselimistön syövät, pääosin vatsa ja suolistosyövät. On jo melko pitkään tiedetty, että esimerkiksi virukset kuten papilloomavirus, voivat aiheuttaa erilaisia kasvaimia mutta bakteerien rooli näitten tautien kehitymisessä on huonommin tunnettua. Bakteerien roolia karsinogeneesissä eli pahanlaatuisten kasvainten kehitymisessä on opittu ymmärtämään paremmin vasta viime vuosina. Vaikka bakteereja ei yleensä ole yhdistetty syöpäsairauksiin, useat bakteerit voivat vaikuttaa kasvainten kehittymiseen. Esimerkiksi *Helicobacter pylorin* aiheuttama gastriitti on yksi suurimmista riskitekijöistä vatsasyövälle. (Polk & Peek, 2010) Myös muiden ruoansulatuselimistön bakteerien roolia suolistosyöpien kehitymisestä on viime vuosina alettu tutkia. Monissa eläinmalleissa, joissa on tutkittu bakteerien vaikutusta kasvainten kehittymiseen, bakteerien on havaittu voimistavan kasvainkudoksen kasvamista, mutta samaan aikaan on havaittu, että kasvainkudoksen kasvaminen on pysähtynyt tai hiipunut kun bakteeri on hävitetty esimerkiksi antibioottikuurilla. (Schwabe & Jobin, 2013) Tämän tutkielman tarkoitus on tarkastella erilaisia mekanismeja, miten jotkin vatsan ja paksusuolen syöpiin yhdistetyt bakteerit alentavat kynnystä suoliston ja vatsan kudosten muuttumista kasvainkudokseksi ja miten ne vaikuttavat kasvainkudoksen kehitykseen. Tutkielman tarkoitus ei siis ole tarkastella kaikkia kasvaimiin yhdistettyjen bakteerien vaikutusmekanismeja. Esimerkiksi paksusuolen syöpä aiheuttaa kaikista syöpätaudeista kolmanneksi eniten kuolemia maailmassa. (Shang & Liu, 2018) Siksi suolistobakteerien roolin ja vaikutusmekanismien ymmärtäminen näissä taudeissa ja niiden kehitymisessä on tärkeää.

Klassisesti syövän ajatellaan johtuvan solun poikkeuksellisesta jakautumisesta geenimutaatioiden vuoksi, mutta myös monet muut tekijät vaikuttavat taudin kehittymiseen. Jotkin bakteerit voivat aiheuttaa suoraan mutaatioita solun perimään, mutta suurin osa

bakteerien karsinogeenisistä vaikutuksista perustuu niiden tuottamiin toksiineihin ja proteiineihin, jotka vaikuttavat geeniekspressioon tai manipuloivat solunjakautumista ja apoptoosia sääteleviä signaalikaskadeja. Esimerkiksi solunjakautumista ja erilaistumista säätelevät WNT/ β -cateniinin signaalointiin voivat vaikuttaa useat eri bakteerit erilaisin mekanismeihin. Ruoansulatuselimistön mikrobiomi vaikuttaa myös yksilön epigenetiikkaan ja ei-koodaavan RNA:n käyttöön. Ruoansulatuselimistön bakteerien metabolian seurauksena voi syntyä karsinogeenisiä molekyyliä. Esimerkiksi proteiinien anaerobinen hajottaminen voi johtaa monenlaisien karsinogeenisten molekyylien tuotantoon kuten ammonian, fenolien ja nitrosoamiinien tuotantoon mutta tähän vaikuttaa paljon yksilön ruokavalio. Näitä karsinogeenisiä molekyyliä syntyy enemmän jos yksilön ruokavaliossa on suhteessa huomattavan paljon proteiineja (Schwabe & Jobin, 2013)

2. Bakteerien aiheuttama tulehdusreaktio ja kasvaimet

Yksi bakteereille yhteinen ja syöpäsairauksien kehittymisen kannalta keskeinen mekanismi on niiden aiheuttama krooninen tulehdus. Elimistö reagoi bakteriaalista alkuperää oleviin antigeneihin ja bakteerien tuottamiin vaurioihin tulehdusreaktiolla. Tulehdusreaktio on tärkeä osa immuunipuolustusta, mutta pitkäaikaisena sillä on karsinogeenisiä vaikutuksia ja nykyään tulehdusreaktiota pidetään yhtenä syöpäsairauksille altistavana tekijänä. (Francescone ym. 2014) Tulehdus saa aikaan useiden eri sytokiinin ja kemotaksiinien tuotantoa, jotka muodostavat ympäristön, joille pitkäaikainen altistus voi vahvistaa kasvainkudoksen kehittymistä. Sytokiineilla on vaurioita korjaavia ja solunjakautumista edistäviä vaikutuksia sillä ne voivat aktivoida useita solunjakautumiseen liittyviä signaalikaskadeja. Tämän vuoksi pitkäaikainen altistus sytokiineille voi johtaa kasvainkudoksen kehittymiseen. Lisäksi neutrofiilien ja makrofagien tuottavat erilaisia reaktiivisia yhdisteitä patogeenien tuhoamiseksi mutta pitkäaikainen altistuminen näille yhdisteille voi saada aikaan DNA-vaurioita. (Xia ym. 2014)

Yksi tulehduksen aktivoima transkriptiofaktori on NF- κ B, (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) joka on yleisesti liitetty erilaisten kasvainten kehittymiseen. (Xia ym. 2014) Esimerkiksi TLR4 (toll like receptor 4)-reseptori voi bakteerialisten antigenien vasteena aktivoida muun muassa NF- κ B transkriptiofaktoria. (Francescone ym. 2014) Sen aktivoiminen johtaa useiden eri solun ja kudoksen elossa säilymiseen liittyvien signaalikaskadien aktivoimiseen. Näitten kaskadien toiminta voimistaa solunjakautumista, voimistaa angiogeneesiä eli verisuonten kehittymistä kasvainten alueelle, inhiboi apoptoosia ja

voimistaa etäpesäkkeiden lähettämistä kasvainkudoksesta. (Xia ym. 2014) Heikentynyt vaste apoptoosiin onkin yksi syöpäsairauksien tunnusmerkeistä. NF- κ B aktivaatioon voi johtaa myös monet muut tekijät. Hiiret, joilta puuttuu toimiva TLR4 reseptori, ovat paljon vähemmän alttiita kroonisen koliitin eli haavaisen paksusuolentulehduksen aiheuttamille kasvaimille kuin yksilöt, joilla on toimiva TLR4-reseptori. (Francescone ym. 2014) Bakterien aiheuttama kudosten vahingoittaminen voi johtaa siihen, että bakteerit ja antigeenien leviävät kudokseen, johon niillä ei normaalisti ole pääsyä, joka voi johtaa hyvin voimakkaaseen tulehdusreaktioon. (Schwabe & Jobin, 2013) Lisäksi bakterien aiheuttamat kudosaauriot voivat johtaa erilaisten vaurioiden korjausmekanismien aktivoimiseen, jotka voivat altistaa kudoksen kasvainten kehittymiselle. (Francescone ym. 2014) Jotkin syöpään yhdistetyt bakteerit pystyvät inhiboimaan elimistön immuunipuolustuksen kasvainkudoksen vastaista toimintaa kasvainkudoksessa. On mahdollista, että immuunipuolustuksen ja immuunisolujen aiheuttama tulehdusreaktio on vaatimus bakterien indusoimalle kasvainten kehittymiselle, sillä tulehduksellisten signaalikaskadien inhibointi estää bakterien aiheuttamien kasvainten kehittymisen tai pysäyttää kasvainkudoksen laajenemisen. (Francescone ym. 2014) Monilla syöpään yhdistetyillä bakteereilla on myös mahdollisen kroonisen tulehdusreaktion lisäksi hyvin spesifejä mekanismeja ja toksineja millä ne voivat vaikuttaa kasvainten kehittymiseen ja immuunipuolustukseen. Näitä mekanismeja on tarkoitus käydä läpi tarkemmin alla.

3.1 *E. coli*

E. coli on yksi yleisimpiä bakteereja suoliston normaalifloorassa. Vaikka sitä ei yleensä mielletä patogeeniseksi bakteeriksi, joillain kannoilla on myös hyvin patogeenisiä ominaisuuksia. Yksi näistä patogeenisistä ominaisuuksista on karsinogeenisyys. Tiettyjen *E. coli*-fylogeneettisten kantojen genomien sisältämä CLB (tunnetaan myös nimellä PKS) patogeeninen geeniklusteri ja sen tuottama colibactiini (colibactin) on paksusuolen syöpään, DNA:n vaurioihin, solusyklin muutoksiin, seneskensiin ja suoliston kasvainten kiihtyneeseen kasvuun eläinmalleissa. (Wilson ym. 2019) Tämä saareke tunnetaan *E. coli* B2-fylogeneettisestä ryhmästä, jossa se on melko yleinen. Se löytyy esimerkiksi *Nissle 1917*-kannasta, jota käytetään paljon probioottisiin hoitoihin. (Nougayrède ym. 2006) CLB-saarekkeelliset *E. coli* kannat ovat ylliedustettuina paksusuolen syöpää sairastavien potilaiden elimistöissä. (Wilson ym, 2019). Paksusuolen syövän kontekstissa, *E. coli* on tutkituimpia bakteereja ja sen vaikutus taudin kehittymiseen on ehkä parhaiten ymmärretty suolistosyöpiin yhdistetyistä bakteereista.

3.2 CLB-saareke

CLB-saareke on noin 54 000-emäsparia pitkä ja se sisältää eräänlaisen ”koneiston” colibaktiini polyketidi-peptidi ”hybridin” tuottamiseksi. Tämä ”koneisto” koostuu kolmesta nonribosomaalisesta peptidi megasyntaasista (megasyntase), kolmesta polyketidi ”megasyntaasista”, kaksi hybridi peptidipolyketidi megasyntaasia (hybrid peptidpolyketide syntase). Näitten entsyymien lisäksi se koodaa yhdeksän avustavaa ja muokkaavaa entsyymiä. Colibaktiini ei ole rakenteeltaan proteiini ja ribosomit eivät osallistu colibaktiinin synteisiin. Lisäksi saareke sisältää myös useita muita virulenssitekijöitä, jotka vaikuttavat muun muassa adheesioon eli bakteerin kykyyn kiinnittyä erilaisille alustoille. Polyketidit ovat melko laaja luokka erilaisia sekundäärisiä metaboliitteja, joita sienet ja bakteerit tuottavat ja niihin kuuluu useita voimakkaita karsinogeenisiä molekyyliä. Sekundäärisellä metaboliitilla tarkoitetaan metaboliittia, joitten tuottaminen ei ole elintärkeää organismille. Systemaattinen mutageneesi on osoittanut, että kaikkia CLB-saarekkeen colibaktiinin synteisiin osallistuvia geenejä tarvitaan genotoksisen vaikutuksen aikaan saamiseksi. (Nougayrède ym. 2006.) Lisäksi saareke sisältää colibaktiinille resistenssin antavan geenin ClbS. Kun tämä geeni poistetaan CLB-saarekkeesta, CLB+ *E. coli*-yksilöt osoittavat autotoksisuutta. (Wilson ym, 2019) Lisäksi sen poistaminen saa aikaan SOS DNA-vahinkoreaktion bakteereissa. (Xue ym, 2019). Colibaktiini on rakenteeltaan melko monimutkainen molekyyli, ja sen erittäin epästabiliin rakenteen vuoksi sen tutkiminen on ollut pitkään melko vaikeaa, mutta sen tarkempi rakenne selvisi vuonna 2019.

3.3 Colibaktiini ja sen vaikutukset

Colibactiini (colibactin) on CLB-saarekkeen tuottama genotoksiini joka aiheuttaa erilaisia vaurioita DNA-juosteisiin, kuten kaksoisjuosteen katkeamisia ja DNA:n silloittumista (cross-link). DNA:n silloittuminen on ilmiö, jossa endo - tai eksogeeninen molekyyli muodostaa kovalenttisen sidoksen DNA-juosteen kanssa. Silloittuminen voi esimerkiksi tapahtua saman juosteen sisällä (intrastrand crosslink) tai juosteiden välillä (interstrand crosslink). Kaksoisjuosteen katkeaminen on yksi vakavampia DNA-vaurioita. Myös pelkkä silloittuminen on erittäin haitallista soluille, sillä se saattaa estää replikaatiota ja translaatiota. (Vizcaino & Crawford, 2015) Mikäli solun DNA-korjausmekanismit epäonnistuvat vaurioiden korjaamisessa, se voi johtaa muun muassa mutaatioihin, jotka johtavat kasvainsolukon kehittymiseen taikka seneskenssiin. Mekanismi, jolla colibaktiini siirtyy soluihin, on toistaiseksi tuntematon. (Wilson ym. 2019) Genotoksisen efektin aikaansaamiseksi bakteerin täytyy olla kontaktissa solun kanssa ja bakteerien eläviä. Genotoksista efektiä ei esimerkiksi

saada aikaan altistamalla bakteerit esimerkiksi colibaktiinia tuottavien bakteerien lysaateille. (Nougayrède ym. 2006)

Colibaktiinin rakenteessa on kaksi elektrofiilistä syklopropania jotka saavat aikaan DNA-vaurioita alkyloimalla DNA:n adeniini-emäksiä. (Xue ym. 2019). Tämä alkylaatio saa aikaan adduktin (adduct) joka voi aiheuttaa mutaation DNA:n replikaatiossa, mikäli DNA:n korjausmekanismit epäonnistuvat sen korjaamisessa. Adduktilla tarkoitetaan DNA-juosteen kohtaa, johon on sitoutunut karsinogeeninen molekyyli. Koska alkyloivia syklopropaneja on kaksi, tämä mahdollistaa myös juosteiden välisen silloittumisen (Xue ym. 2019). Tämä voi johtaa kaksoisjuosteiden katkeamiseen. (Viczaino, 2015) DNA:n kaksoisjuosteen katkeaminen on pystytty todentamaan seuraamalla H2AX-histoniproteiinin fosforylaatiota colibaktiinille altistetuissa soluissa. H2AX-fosforylaatio on ollut sitä voimakkaampi, mitä suuremmalle määrälle bakteereja solut on altistettu. (Nougayrède ym. 2006) H2AX-histoniproteiinin fosforylaatio on DNA-kaksoisjuosteiden katkeamisen herkkä ilmentäjä. Lisäksi colibaktiinille altistetuissa soluissa on havaittu ATM (Ataxia-telangiectasia mutated)-proteiinin ja CHK2-proteiinien aktivoitumista, jotka ovat molemmat keskeisiä proteiineja DNA-vaurioihin liittyvässä vasteessa. (Nougayrède ym. 2006) Lisäksi SSGE-menettelmän (single cell gel electrophoresis assay) avulla on pystytty havaitsemaan colibaktiinille altistetuissa soluissa kaksoisjuosteen katkeamisia. (Nougayrède ym. 2006)

3.4 Colibaktiinin aiheuttamat mutaatiot

Erilaisia solulinjoja colibaktiinille altistamalla ja sen jälkeen solujen genomien sekvensoinnilla on voitu tutkia sen aiheuttamia mutaatioita. Sekvensoimalla näiden näytteiden genomit ennen ja jälkeen colibaktiinia tuottavalle bakteerille altistamiselle, on havaittu, että colibaktiini aiheuttaa tietyn tyyppisiä indel-mutaatioita. Näitä mutaatioita ei ole havaittu kontroleissa, jotka on altistettu toimimattomalle CLB-saarekkeelle. (Pleguezuelos-Manzano ym. 2020) Näistä mutaatioista on päätelty colibaktiinin aiheuttamien mutaatiojälki (mutational signature) jotka ovat indel-muutoksia adeniinin ja tymiinin kohdalla. Colibaktiini aiheuttaa huomattavan paljon tymiinin substituuutioita ATA, ATT, ja TTT, sekvensseihin, jossa alleviivattu emäs substituoitunut. Lisäksi se aiheuttaa deleetioita tymiiniä sisältäviin homopolymeereihin. (Pleguezuelos-Manzano ym. 2020) Colibaktiini aiheuttaa myös muun tyyppisiä mutaatioita, mutta yllä kuvatun tyyppiset mutaatiot ovat yleisimpiä sen aiheuttamia mutaatioita. Samanlaista mutaatiojälkiä on havaittu erilaisissa suolistosyövien etäpesäkkeiden genomien sekvenssidatassa tilastollisesti merkitseviä määriä, mikä vahvistaa colibaktiinin roolia taudin

kehittymisessä. (Pleguezuelos-Manzano ym. 2020) Etäpesäkkeet sisältävät samat mutaatiot kuin alkuperäinen kasvainkudos, josta tauti ja etäpesäkkeet ovat levinneet. Tämän vuoksi ne soveltuvat kasvainten mutaatiohistorian tutkimiseen. Tätä mutaatiojälkeä vastaavia muutoksia löytyi onkogeneista, jotka ajavat taudin kehittymistä. (Pleguezuelos-Manzano ym. 2020) On siis selkeitä viitteitä siitä että, colibaktiinin aiheuttamat DNA-vauriot kumuloituessaan voivat aiheuttaa suolistosyöpiä. Colibaktiinin aiheuttamia mutaatiojälkiä tutkiessa sitä löydettiin myös kaulan ja pään alueen kasvaimissa, joiden alueella on ollut *E. coli*n aiheuttama tulehdus, mutta colibaktiinin roolia muiden syöpäsairauksien kuin suolistosyöpien kehittymisessä ei tunneta eikä aihetta ole vielä tutkittu. (Pleguezuelos-Manzano ym. 2020)

3.5 Colibaktiinin aiheuttama seneskenssi ja kasvutekijät

Muita colibaktiiniin havaittuja vaikutuksia ovat muun muassa solusyklin pysähtyminen interfaasin G2 ja mitosisin välivaiheeseen. (Nougayrède ym. 2006) Näissä soluissa, joitten solusykli on pysähtynyt, on havaittu ATM-proteiinin synteesiä, jolla kuten aiemmin mainittiin, on keskeinen rooli DNA-vaurioiden vasteessa. Nämä muutokset johtuvat DNA-vauriosta ja niiden aktivoimista korjausmekanismeista. DNA-vaurioista johtuvan ATM-proteiinin aktivointi saa aikaan CHK2-proteiinin aktivoimista joka fosforyloi CDC25C-proteiinia. Tämä johtaa sen inaktivaatioon, jonka jälkeen CDC25C ei voi enää defosforyloida CDK1-proteiinia (cyclin-dependant kinase-1) (Nougayrède ym. 2006). Tämä johtaa solusyklin pysähtymiseen, sillä CDK1 on tärkeä solusyklin säätelijä, jonka defosforylaatio johtaa solusyklin etenemiseen.

Colibaktiinin aiheuttama solusyklin pysähtyminen voi johtaa kasvaneeseen kasvutekijöiden ekspressioon. Puutteellisella immuunipuolustuksen omaavilla hiirillä (nude mice) tehdyissä eläinkokeissa on osoitettu, että CLB+ *E. coli* kannoilla on myös vaikutuksia solun kasvutekijöiden ekspressioon. ”Nude mice”-hiiret tuottavat huomattavan paljon vähemmän T-soluja, mikä mahdollistaa helpomman bakteerien vaikutusten tutkimisen. CLB+ *E. coli*lle infektiolle altistetut solut tuottavat eläinkokeissa huomattavasti suurempia määriä HGF, FGF ja GM-CSF kasvutekijöitä kuin toimimattoman CLB-saarekkeen sisältäville *E. coli* infektiolle altistetut solut. (Dalmaso ym. 2014) Erityisesti HGF-kasvutekijä on havaittu olevan tärkeä suolistosyövän kehittymisen kannalta, sillä sen inhibointi hidastaa kasvainsolukon kehittymistä. Kasvutekijöiden kasvaneen ekspression taustalla on seneskenssissä olevien solujen tuottamat kasvutekijät, jotka vaikuttavat myös tulehtumattomien solujen jakautumiseen, voimistaen mahdollisen syöpäsolukon kehittymistä ja invasiivisuutta. *E. coli* indusoi näiden kasvutekijöiden syntyä seneskenssiin siirtyneistä soluista. (Dalmaso ym. 2014)

Solut ajautuvat seneskenssiin P53-proteiinin post-translationalisen SUMO-modifikaation muutoksen kautta. MiR 20-5p-microRNA säätelee SEN1P-proteiinin toimintaa, joka on oleellinen proteiini SUMO-modifikaation säätelyssä. *E. coli* lisää miR-20-5p-mikroRNA:n ekspressiota, joka sitoutuu SEN1P-proteiinin lähetti-RNA:han. Tämä johtaa SEN1P-proteiiniin vähentyneeseen ekspressioon, mikä taas johtaa solujen ajautumiseen seneskenssiin. (Dalmasso ym. 2014) miR-20-5p ekspressiota lisää c-Myc transkriptiofaktori, joka aktivoituu DNA-vaurioiden seurauksena. c-MYC kuuluu MYC-geenien perheeseen ja se on proto-onkogeeni. c-MYC-siRNA:ta transfektoimalla *E. coli* infektoimiin soluihin eli hiljentämällä c-Myc ekspressio, kasvutekijöiden lisääntynyt ekspressio on lakannut. (Dalmasso ym. 2014) *E. coli* tuottaman colibaktiinin aiheuttamat DNA-vauriot lisäävät siis myös kasvutekijöiden määrää. Tätä ilmiötä on havaittu myös ihmisen adenokarsinoomasta otetuissa biopsioissa, jotka ovat myös ekspresseineet normaalia määrää enemmän kyseisiä kasvutekijöitä ja DNA-vaurioiden merkkiaineita. (Dalmasso ym 2014). CLB+ *E. coli* voi hidastaa myös syöpäsolukon jakautumista tietyissä olosuhteissa aiheuttaen niin voimakasta seneskenssiä että jakautuminen hidastuu. Koska colibaktiini ei ole diffuosoituva toksiini, vaan bakteerien täytyy olla suorassa kontaktissa solujen kanssa, vain osa solukosta ajautuu seneskenssiin. Tämä johtaa ympäristön kehittymiseen, jossa seneskenssiin ajautuneet solut voimistavat mahdollisten syöpäsolujen solunjakautumista ja täten voimistaa myös kasvainkudoksen kehittymistä. (Dalmasso ym. 2014)

3.6 CNF-proteiini

E. coli voi tuottaa myös muita potentiaalisesti karsinogeenisiä molekyyliä. Yksi niistä on CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor). Se on proteiini, jonka on muun muassa havaittu vaimentavan apoptoosia soluissa mutta sillä on muita potentiaalisesti karsinogeenisiä ominaisuuksia. (Fabbri ym. 2013). Tämä toksiini sitoutuu lamiini-reseptoriin, jonka jälkeen se siirtyy solun sisälle endosytoosilla jossa se vaikuttaa Rho-GTPaasien toimintaan.(Fabbri ym. 2013) Rho-GTPaasit ovat G-signalointiproteiinien perhe, jotka säätelevät esimerkiksi solun rakennetta ja solusykliä. CNF deaminoi näissä proteiineissa glutamiinimotiivit, joihin normaalisti sitoutuisi näitä proteiineja hajottavat GTP-hydrolyysit. Tämä johtaa siihen, että Rho-GTPaasien toiminta jatkuu epänormaalin pitkään, mikä voi johtaa solun tukirangan ja solusyklin muutoksiin. Tämä kasvattaa solujen liikkuvuutta, mikä saattaa johtaa uusien etäpesäkkeiden syntyyn kasvainsolukosta. CNF voi myös aiheuttaa solusyklin pysähtymistä G2/M-vaiheeseen. (Fabbri ym. 2013) CNF saa lisäksi aikaan tulehdusreaktion solussa, joka johtaa NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transkriptiofaktorin ekspressioon ja se lisää

myös COX2 (Cyclo Oxygenase 2) ekspressiota, joka myös voimistaa tulehduksellisia reaktioita. Se voi aktivoitua bakteeri tai virusinfektiosta, DNA-vaurioista taikka sytokiinin tai kasvutekijöiden ekspressiosta. NF- κ B:n aktivoituminen saa aikaan Bcl2-perheen proteiinien ekspressiota, jotka inhiboivat apoptoosia. (Xia ym. 2014) NF- κ B:n epänormaali toiminta liittyy useisiin eri kasvaimiin ja kuten aiemmin mainittiin, se on yksi mekanismi miten pitkäaikainen krooninen tulehdus voi vaikuttaa kasvainten kehittymiseen. (Xia ym. 2014) Tämä mahdollistaa sen, että soluissa tapahtuneet mutaatiot eivät välttämättä aiheuta solun apoptoosia, toisin kuin soluissa, joissa apoptoosin säätely toimii normaalisti. Täten CNF voi voimistaa kasvainkudoksen jakautumista suojelemalla mutatoituneita soluja apoptoosilta. (Fabri ym. 2013) CNF voi esiintyä yhdessä CLB-saarekkeen kanssa *E. coli* genomissa, mutta on olemassa kantoja, joissa on joko vain CLB saareke tai CNF-geeni. (Buc ym. 2013)

E. coli siis pystyy vaikuttamaan karsinogeneesiin sekä DNA-vaurioiden että DNA-vaurioiden indusoimien kasvutekijöiden kasvaneen ekspression kautta ja lisäksi se voi mahdollisesti inhiboida apoptoosia. Vaikka se aiheuttaa DNA-vaurioita ja vaikuttaa kasvutekijöiden määrään, isännän geneettinen alttius kasvaimille ja solujen kyky korjata DNA-vaurioita vaikuttavat taudin kehittymiseen.

4.1 *Helicobacter Pylori*

Helicobacter Pylori on gram-negatiivinen bakteeri, joka kolonisoii ihmisen vatsan epiteelisoluja. Se aiheuttaa mahan limakalvotulehduksen eli gastriitin. *H. pylorin* aiheuttama pitkäkestoinen, jopa vuosikymmeniä kestävä krooninen limakalvotulehdus on myös yksi riskitekijöistä vatsasyövän kehittymiselle. Tästä huolimatta melko pieni osa *H. pylorin* aiheuttamista tulehduksista, vain 1–3 % *H. pylori* infektiosta johtaa syövän kehittymiseen. (Schwabe & Jobin, 2013) Tämä johtuu *H. pylorin* virulenssiin liittyvästä suuresta geneettisestä muuntelusta. Vaikka prosentuaalisesti tämä lukema on melko pieni, globaalisti se vaikuttaa silti paljon syöpätautikuolleisuuteen sillä *H. pylori*-infektio on yksi maailman yleisimpiä bakteeri-infektioita. (Schwabe & Jobin, 2013) *H. pylorin* potentiaalinen karsinogeeninen vaikutus perustuu sen tuottamiin useisiin erilaisiin onkoproteiineihin eli syöpää aiheuttaviin proteiineihin. Nämä proteiinit vaikuttavat isäntäsolun immuunipuolustukseen ja ruoansulatuselimistön soluihin lukuisilla eri tavoilla. kuten manipuloidulla signaalikaskadeja ja inhiboimalla monien eri entsyymien ja proteiinien toimintaa. Lisäksi *H. pylorin* aiheuttamalla kroonisella tulehduksella on rooli taudin kehittämisessä. (Polk & Peek, 2010)

4.2 VacA-proteiini

Yksi *H. pylori*n tuottama potentiaalisesti karsinogeeninen proteiini on nimeltä VacA. VacA on sytotoksiini ja sitä koodaa samanniminen geeni. Epidemiologisissa tutkimuksissa sen on havaittu korreloivan vatsasyöpien kanssa. *H. pylori* kannat, jotka tuottavat aktiivista VacA-proteiinia in vitro-olosuhteissa ovat assosioitu korkeampaan syöpäriskiä kuin kannat, jotka tuottavat inaktiivista VacA:ta. (Polk & Peek, 2010) Kaikki *H. pylori*-kannat kantavat VacA-geenin, mutta geenin sisällä on paljon vaihtelua eri alleelimuotojen välillä, mikä selittää VacA:n aiheuttaman vasteen varianssin. Jokainen VacA-geeni sisältää yhden alleelin geenin signalointisekvenssin. 5-pilkku pään signaalisekvenssistä tunnetaan s1a, s1b, s1c ja s2 alleelit. Geenin keskialueelta (mid-region) tunnetaan alleelit m1 ja m2, ja välittäjä (intermediate region) alueelta i1 ja i2 alleelit. (Rhead J ym, 2007). Näitten alleelien muuntelu selittää VacA:n erilaiset vasteet isännässä. (Polk & Peek, 2010) S1 ja m1 alleelit ovat voimakkaimmin yhdistetty vatsasyöpiin. (Polk & Peek, 2010) VacA-sytotoksiini saa aikaan lukuisia erilaisia vasteita isäntäsoluissa. Se sitoutuu useihin erilaisiin epiteelisolujen kalvon komponentteihin kuten fibronectiiniin, EGFR:n (epidermal growth factor receptor), erilaisiin lipideihin, sphingomyeliiniin ja transmembraaniseen proteiini reseptori tyyppi proteiini fosfataasiin. Lisäksi VacA sitoutuu CD-18 reseptoriin. VacA indusoi vakuolaatiota eli vakuolien syntymistä endosomista ja apoptoosia vatsan epiteelisoluissa. VacA saa aikaan sytokromi C:n vapautumista mitokondriosta muodostamalla huokosia (pore) mitokondrion membraaneihin. Tämä saa aikaan kaspasi-3:sen aktivoitumista. (Polk & Peek, 2010) Kaspasit ovat proteiineja, joilla on keskeinen rooli apoptoosin aktivoimisessa ja niiden aktivointi saa aikaan signaalikaskadin, joka johtaa solun apoptoosiin. S1-signaali alleelin sisältävät kannat stimuloivat apoptoosia voimakkaammin kuin S2 alleelin sisältävät kannat. (Polk & Peek, 2010) VacA:lla on myös immuunipuolustusta inhiboivia vaikutuksia. VacA sitoutuminen CD18-reseptorin integrin Beta 2-proteiiniin saa aikaan signaalikaskadin, joka estää antigeenille altistuneiden T-solujen jakautumisen. Integrin Beta 2 on proteiini, joka on osa immuunisolujen pinnalla olevia reseptoreita. Sen sitoutuminen inhiboi kalsiumioneista riippuvaista kalsineuriini (calsineurin) fosfataasin toimintaa. Kalsineuriini aktivoi NFAT-transkriptiofaktorin toimintaa, joka aktivoi IL2-interleukiinin ja IL-2 reseptori alfan (IL2-receptor alfa) koodausta, joka aktivoi T-solujen toimintaa. (Polk & Peek, 2010) Tämän mekanismin inhiboinnin avulla *H. pylori* välttää bakteriaalisten antigeenien aikaan saaman immuunivasteen T-soluissa. Nämä immunosuppressiiviset vaikutukset vaikuttavat pääosin ihmisen CD4+ T-soluissa. (Polk & Peek, 2010)

4.3 Ulkokalvon proteiinit

H. pylori koodaa myös useita solun ulkokalvolle sijoittuvia proteiineja, jotka sitoutuvat erilaisiin reseptoreihin suoliston epiteelisolujen pinnalla ja ne ovat yhdistetty kasvainten kehittymiseen. (Polk & Peek, 2010) BabA on yksi *H. pylorin* erittämä adhesiini, joka on yhdistetty kasvainten kehittymiseen. Sitä koodaa tiettyihin *H. pylori* kantoihin spesifi babA2-geeni. (Polk & Peek, 2010) Se sitoutuu Lewis B-antigeeneihin ruoansulatuselimistön epiteelisolujen pinnalla. (Polk & Peek, 2010) SabA on myös ulkokalvolle eritettävä proteiini, joka sitoutuu sialyl-LewisX antigeeneihin, mikä on kasvainten antigeeni ja ruoansulatuselimistön dysplasian merkkiaine. *H. pylori* käyttää molekulaarista matkimista (molecular mimicry) välttääkseen immuunivasteen toiminnan, sillä se ekspressoi pinnallaan Leviksen antigeenejä. (Polk & Peek, 2010) Lewiksen antigeenit ovat yksi ihmisen veriryhmäjärjestelmä. OipA eritetään myös solun ulkokalvolle ja sen on havaittu säätelevän tulehdusta voimistavien sytokiinien ekspressiota, kuten IL-8, IL-6 ja RANTES ja myös muita taudin kehittymiseen liitettyjen molekyylien kuten MMP1:sen. (Matrix Metalloproteinase1) ekspressiota. (Polk & Peek, 2010) Lisäksi se liittyy *H. pylorin* kykyyn kiinnittyä vatsan epiteelisoluihin ja sen on havaittu käynnistävän β -cateniini aktivaatiota. Näitten ulkokalvolle eritettävien proteiinien alleviivaa *H. pylorin* ja epiteelisolujen suoran kontaktin merkitystä taudinkehittymisessä. (Polk & Peek, 2010)

4.4 Cag-patogeeninen saareke

H. Pylorin genomien Cag-patogeenisen saarekkeen on havaittu lisäävän ruoansulatuselimistösyöpien riskiä. Saareke koodaa proteiinia CagA ja bakteriaalista T4SS erityssysteemiä, (T4SS Bacterial secretion system). (Polk & Peek, 2010) T4SS-systeemi on molekulaarista injektioneulaa muistuttava rakenne, jonka avulla bakteerit voivat erittää erilaisia proteiineja eukaryoottisoluihin. Systeemi mahdollistaa bakteerin tuottamien proteiinien viemisen kohdesoluun. Patogeenisen saarekkeen terminaalinen pää tuottaa onkoproteiiniä CagA. CagA vaikuttaa isäntäsolussa useilla eri tavoilla, jotka kontribuovat kasvainkudoksen kehittymiseen. CagA siirtyy kohdesoluun bakteerin T4SS-systeemin avulla, jossa se fosforyloituu. (Polk & Peek, 2010) CagA-proteiinia on tutkittu transgeenisen ekspression avulla hiirissä ja se johtaa kasvaneeseen ruoansulatuselimistön solujen jakautumiseen, karsinooman kehittymiseen ja sen on havaittu vaimentavan apoptoosia in vitro ja in vivo olosuhteissa. (Polk & Peek, 2010) CagA hyödyntää isäntäsolun integriinireseptoreita soluun siirtymisessä, T4SS-systeemiä ja CagL-proteiinia, jotka mahdollistavat proteiinin siirtymiseen soluun ja sen että isäntäsolun kinaasit ABL ja SRC-tyrosiini fosforyloivat CagA-proteiinin.

CagA-proteiinilla on runsaasti erilaisia vasteita isäntäsolussa. Fosforyloitunut CagA aktivoi SHP2-fosfataasia, joka saa aikaan morfologisia muutoksia, jotka muistuttavat kasvutekijöiden stimuloinnin aiheuttamia muutoksia. SHP2 on tärkeä proteiini solun sytokiiniinien ja kasvutekijöihin vaikuttavassa signaaloinnissa ja täten sillä on tärkeä rooli myös solun jakautumisessa ja erilaistumisessa. CagA-SHP2 interaktio vaikuttaa solun tukirangan muutoksiin ja solun elongaatioon vaikuttamalla RAP1A-BRAF-ERK-signalikaskadiin. (Polk & Peek, 2010) Myös fosforyloimattomalla CagA:lla on runsaasti erilaisia vaikutuksia isäntäsolussa. Sen fosforyloitumista säätelee fosforyloituneen CagA:n muodostama takaisinkytkentämekanismi. Fosforyloimattomana se voi intearktioida muun muassa E-cadherin-proteiinin kanssa, HGFR (hepatocyte growth factor receptor, tunnetaan myös nimellä c-MET) ja PAR1B-proteiinin kanssa. (Polk & Peek, 2010)

Fosforyloimaton CagA:n on havaittu sitoutuvan PAR1B-proteiiniin, jolloin sen kinaasiaktiivisuus inhiboituu. (Polk & Peek, 2010) PAR1B toimii mikrotubulien affiniteettia säätelevänä kinaasina, joka fosforyloi mikrotubuleihin sitoutuvia proteiineja. Tämä johtaa tumasukkuloiden muodostumisen häiriöihin solunjakautumisessa ja voi johtaa kromosomaaliseen epävakauteen, kuten kromosomien eroamisen epäonnistumiseen ja aneuploidiaan. (Polk & Peek, 2010) Tämä vaikutus on riippuvainen CagA-proteiinin C-terminaalisen päään 16-aminohapon toistuvista motiiveista (motifs). Nämä proteiinin kohdat sitoutuvat PAR1B-proteiinin substraattiin sitoutuviin kohtiin, joka johtaa sen kinaasi-funktion inhiboitumiseen. Lisäksi nämä kohdat säätelevät CagA dimerisoitumista, mikä vahvistavat sen SHP2-fosfataasiin sitoutumista. (Polk & Peek, 2010) Cag-patogeenisen saarekkeen toinen vaikutus isäntäsolussa on erilaisten kemokiinien tuotto. Kemokiinit ovat sytokiineja, jotka saavat aikaan soluissa kemotaksiinia. Mekanismi, miten Cag-saareke vaikuttaa kemokiinien tuotantoon, ei ole kovin tarkkaan tunnettu. Tietyt *H. pylori* kannat voivat indusoida IL-8-interleukiinin tuotantoa mutta tämä ominaisuus ei siis ole universaali kaikille Cag-saarekkeen omaaville kannoille. IL-8 saa aikaan kemotaksiinia neutrofiileissä ja granulocyteissa eli siirtymistä kohti tulehduksen aluetta. IL-8 lisää myös oksiditaavista stressiä ja sen on arveltu liittyvän myös syövän kehittymiseen autokriinisen kasvuhormonituotannon kautta.

4.5 Peptidoglykaanit

H. Pylori kykenee kuljettamaan peptidoglykaaneja isäntäsoluun vesikkelien ja T4SS-systeemin avulla. Peptidoglykaanit ovat polymeerejä, jotka koostuvat aminohapoista ja sokereista ja niitä on muun muassa bakteerien soluseinän rakenteessa. Solussa peptidoglykaanit aktivoi NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain 1), sytosolin patogeenien tunnistus reseptoria, joka

stimuloi NF- κ B, P38 ja ERK aktivaatiota, jotka saavat aikaan MIP2 ja IL-8 sytokiinien ekspressiota. Peptidoglykaanit saavat aikaan myös tyypin 1 interferonien tuotantoa, joitten aktivointi on yleensä liitetty virusinfektioon. Peptidoglykaanin siirtyminen soluun tutkimusten mukaan johtaa PI3K kinaasin aktivaatioon ja solun uudelleensijoittumiseen (cell migration). Solun uudelleensijoittuminen on oleellinen osa kehon immuunipuolustusta, mutta virheet siinä voivat johtaa syövän kehittymiseen ja pitkään jatkunut solujen uudelleen sijoittumisen aktivointi voi johtaa karsinogeneesiin. PI3K kinaasi toimii PI3K/AKT/Mtor signaalikaskadissa, joka säätelee solusykliä ja tätä kautta se on yhdistetty myös syöpien kehittymiseen. Tämä signaalikaskadi on yliaktiivinen monissa kasvainsolukoissa. (Hoxhaj & Manning, 2020)

4.6 *H. pylori* ja β -cateniini

H. pylori voi aiheuttaa onkogeenisen kaskadin solussa vaikuttamalla useiden eri reittien kautta tapaa β -cateniini proteiinin (Beta-catenin). β -cateniini on solun tuottama proteiini, joka toimii solukalvolla aktiivisytoskeletonin välisissä liitoksissa E-cadherinin (E-cadherin) avulla. Tämän lisäksi se toimii WNT-signaalikaskadissa, joka säätelee tumassa geeniekspressiot. Tämän signaalikaskadin virheellinen toiminta on yhdistetty erilaisiin kasvaimiin. β -cateniinin toimintaa inhiboi normaalisti kasvunrajoitegeeni APC (Adenomatous polyposis coli) ja GSK3 β (Glykogen synthase kinase 3-Beta) entsyymit. β -cateniinin liian suuri määrä voi johtaa sen kohdegeenien yliekspressioon. β -cateniinin yliekspressiota tai APC:n mutaatiota havaitaan yli 50 %-adenokarsinoomissa eli pahanlaatuisissa rauhasmaista kudosta muistuttavissa kasvaimissa ja se on myös tyypillinen mutaatio myös suolistosyövässä. (Polk & Peek, 2010) Myös monet muut kasvaimiin yhdistetyt bakteerit aktivoivat β -cateniinin signalointia erilaisin mekanismein. APC:n mutaatioita tai virheellistä toimintaa ei kuitenkaan ole yhdistetty vatsasyöpään, mikä viittaa siihen, että β -cateniinin kertymiseen vatsan epiteelisolujen tumaan johtaa jokin toinen tekijä. (Song ym. 2015) Kuten aiemmin mainittiin, fosforyloimaton CagA voi sitoutua E-cadheriiniin, mikä inhiboi β -cateniinin ja E-cadheriinin kompleksien muodostumista. Tämä johtaa β -cateniinin kertymiseen tumassa, jossa se muodostaa TCF/LEF transkriptiofaktorin kanssa kompleksin, joka johtaa β -cateniinin kohdegeenien yliekspressioon kuten CDX1-transkriptiotekijän (Caudal type homeobox 1) yliekspressioon. CDX1 on sisäelinten soluille spesifi transkriptiotekijä ja sen aktivoitumista pidetään vaatimuksena metaplasian kehittymiselle. Myös aiemmin mainittu PI3K aktivointi voi johtaa GSK3 β entsyymin inhibointiin, joka johtaa β -cateniinin kertymiseen sytoplasmaan ja tumaan. PI3K ja AKT molemmat fosforyloivat GSK3B entsyymiä, joka johtaa sen inaktivoitumiseen. *H. pylori* voi lisätä β -cateniinin kertymistä tumaan aktivoimalla EGFR:ää. (Polk & Peek, 2010) EGFR:n

aktivoimiseen vaaditaan proteiinit VacA, OipA, *H. pylori*in erittämä proteiini HP0175 sekä CagL ja CagE, jotka ovat T4SS-systeemin rakenteellisia osia. EGFR:n aktivointi johtaa myös PI3K/AKT signalointiketjun aktivoimiseen. Lisäksi EGFR:n aktivointi on yhdistetty *H. pylori* infektiossa vaimentuneeseen apoptoosiin. (Polk & Peek, 2010) *H. pylori*in aiheuttama EGFR-aktivointi vaikuttaa myös B-kateeniin käytökseen. Tämän reseptorin aktivointi johtaa myös PI3K/AKT aktivointiin, joka edelleen johtaa β -cateniinin kertymiseen. (Song ym. 2015) *H. pylori* vaikuttaa siis useiden eri mekanismeihin kautta β -cateniinin käytökseen solussa.

H. pylori voi vaikuttaa vatsan kasvainten kehittymiseen myös sen pitkäaikaisen kroonisen tulehduksen kautta. *H. pylori* aktivoi NF- κ B:n toimintaa, joka johtaa samanlaisiin muutoksiin kuin *E. coli*n aiheuttama NF- κ B aktivointi. Lisäksi se aktivoi TNF-Alfaa (Tumor Necrosis Factor-alfa), joka on sytokiini, jonka on havaittu inhiboivan GSK3 β toimintaa, joka johtaa kasvaneeseen β -cateniinin signalointiin. (Polk & Peek, 2010)

4.7 *H. pylori* Yhteenveto ja yhteys paksusuolen syöpään

*H. pylori*lla on siis useita erilaisia virulenssitekijöitä, jotka aktivoivat vatsan epiteelisoluissa useita eri signaalikaskadeja, jotka johtavat neoplasian ja vatsan kasvainten kehittymiseen. Tämän vuoksi on vaikea arvioida mikä näistä lukuisista tekijöistä vaikuttaa voimakkaasti vatsasyövän kehittymiseen. *H. pylori*in rooli muitten ruoansulatuselinten syöpiin on toistaiseksi melko epäselvä. On viitteitä siitä, että se voisi myös vaikuttaa suolistosyöpien syntyyn, sillä vaikka *H. pylori*in luonnollinen elinympäristö on vatsa, se on yhdistetty epidemiologisissa tutkimuksissa myös paksusuolen syöpään. (Butt & Epplein, 2019) Kuitenkin, potentiaaliset mekanismit miten *H. pylori* voisi vaikuttaa suolistosyöpien kehittymiseen ovat toistaiseksi tuntemattomia ja vain muutama tutkimus on selvittänyt *H. pylori*in roolia paksusuolen syövässä ja nämä tutkimukset ovat olleet lähinnä epidemiologisia. Kuitenkin on havaittu, että pitkäaikainen krooninen *H. pylori* tulehdus korreloi suolistosyöpien ja niiden huonon ennusteen kanssa. (Butt & Epplein, 2019) Tutkimukset eivät kuitenkaan ottaneet kantaa potentiaalisiin taudin aiheuttamismekanismeihin tai korreloiko esimerkiksi suolistosyöpä myös *H. pylori*in aiheuttaman vatsasyövän kanssa. On kuitenkin olemassa useita erilaisia hypoteeseja siitä, millaisilla mekanismeilla *H. pylori* voisi vaikuttaa suolistosyöpien kehittymiseen. (Butt & Epplein, 2019) *H. pylori*in potentiaalista roolia suolistosyöpien kehittämisessä tulisi siis tutkia tarkemmin.

5.1 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum on melko yleinen gram-negatiivinen anaerobinen bakteeri. Se muun muassa aiheuttaa suun alueella erilaisia tulehduksia, mutta se on yhdistetty myös lukuisiin muihin sairauksiin. Se on liitetty myös suolistosyöpien kehittymiseen, sillä *F. nucleatum*in määrät ovat korkeampia suoliston kasvainkudoksissa kuin terveissä kontrolleissa. (Brennan & Garrett, 2019) *F. nucleatum*in runsaus on yhdistetty myös lyhyempään elinikään suolistosyövistä kärsivillä potilailla. Lisäksi sen runsaus on yhdistetty erilaisiin mutaatioihin BRAF, CHD7, CHD8 ja TP53-geeneissä ja sen on havaittu aiheuttavan mikrosatelliittien epävakausta sekä GPC-saarekkeen metylaatiofenotyyppiä. (Shang & Liu, 2018) Tästä yhteydestä huolimatta sen tarkempi yhteys syöpäsolujen genetiikkaan ja epigenetiikkaan vaatii lisää tutkimuksia, sillä toistaiseksi sen ei tunneta tuottavan mitään DNA-vaurioita tai genomin epävakausta aiheuttavia toksiineja. (Brennan & Garrett, 2019) *F. nucleatum*ilta tunnetaan kuitenkin muita karsinogeenisiä ominaisuuksia. *F. nucleatum*in injektoiminen esimerkiksi puutteellisten kasvunrajoitegeenin Apc:n omaavilla hiirillä suuhun on riittänyt siihen, että suoliston alueelle on kehittyä kasvaimia suoliston alueelle. *F. nucleatum*in tunnetut karsinogeneesiin liittyvät mekanismit perustuvat solunjakautumista edistävien toksiinien tuottoon ja immuunipuolustuksen vaimentamiseen.

5.2 *F. nucleatum*in virulenssitekijät

*F. nucleatum*ilta tunnetaan suolistosyöpiin yhdistettyä virulenssitekijää, FadA ja Fap2. FadA muuttaa epiteelisolujen geeniekspressiota muuttamalla β -cateniinin signaalintireittiä. Fap2 taas inhiboi immuunisolujen aktiivisuutta. FadA:ta on löydetty myös suolistosyöpien biopsioista mikä vahvistaa sen roolia kasvainten kehittymisessä. (Shang & Liu, 2018) FadA on proteiini ja siitä on kaksi erilaista muotoa. Ensimmäinen muoto on preFadA, joka on kiinni bakteerin solukalvolla ja on 129 aminohappoa pitkä ketju. Varsinainen eritetty aktiivinen FadA eritetään bakteerisolun ulkopuolelle ja se on 111-aminohappoa pitkä. Nämä kaksi aminohappoa muodostavat aktiivisen kompleksin, jotka saavat aikaan FadA:n patogeenisen vaikutuksen. Aktiivinen FadA sitoutuu CDH5-reseptoriin. (Vascular endothelial cadherin 5) *F. nucleatum* tunkeutuu solujen sisälle tämän reseptorin avulla. Tämä tunkeutuminen saa aikaan useiden erilaisten sytokiiniin, erityisesti IL-8, IL-10 ja tuumorinekroositekijä-alfan (tumor necrosis factor-alfa) ekspressiota, jotka saavat aikaan tulehdusta voimistavan ympäristön. Tämä voimistunut tulehdus voi alentaa kynnystä kasvainten kehittymistä. (Shang & Liu, 2018)

Toinen reseptori mihin aktiivinen FadA sitoutuu, on wnt7b E-cadherin reseptori joko sytosolissa tai transmembraaneilla epiteelisoluissa. (Shang & Liu, 2018) Tämä voimistaa β -

cateniinin signalointia, joka saa aikaan onkogeenisin kaskadin aiemmin kuvatulla tavalla. Mekanismi perustuu FadA:n sitoutumiseen sytoplasmassa tai transmembraanilla sijaitsevien E-cadherin domaineihin joka johtaa E-cadherinin fosforylaation. Tämä aiheuttaa kaskadin, joka johtaa β -cateniinin fosforylaation vähenemiseen ja β -cateniinin kertymiseen tumaan, joka johtaa aiheuttamaan poikkeukselliseen geeniekspressioon samalla tapaa kuin aiemmin mainitut muutokset β -cateniinin liittyvässä signaloinnissa. (Shang & Liu, 2018) Lisäksi *F. nucleatumille* altistettujen solujen on havaittu lisäävän microRNA-21 ekspressiota aktivoimalla TLR4 (toll-like receptor 4) -signalointia MYD88-signalointiproteiiniin, (myeloid differentiation primary response 88) joka johtaa onkogeenisin kaskadiin. TLR4 aktivoi MYD88 ekspressiota joka johtaa NF- κ B ekspresioon ja hyperaktiivinen NF- κ B liittyy microRNA21-promoottoriin. TLR4, MyD88 ja microRNA-21 yliekspressio on yhdistetty suolistosyöpien huonoon ennusteeseen. (Shang & Liu, 2018) microRNA21 hiljentää useiden eri kasvunrajoitegeenien ekspressiota. Lisäksi NF- κ B aktivointi voi alentaa kynnystä kasvainten kehittymiseen aiemmin kuvatuin mekanismein. (Shang & Liu, 2018)

5.3 *F. nucleatum* ja immuunivaste

F. nucleatum inhiboi immuunivasteen kasvainsolukkoa vastustavaa toimintaa useilla eri mekanismeilla. Yksi näistä mekanismeista toimii vähentämällä CD3⁺ T-solujen toimintaa. (Shang & Liu, 2018) Immuunivasteen inhibointi lisää myös syövän kehittymisen mahdollisuutta, sillä immuunipuolustus tuhoaa paljon hallitsemattomasti jakautuvia soluja. Tutkimuksissa on havaittu että *F. nucleatum* ekstrakti inhiboi T-solujen vastetta antigeeneihin ja mitogeeneihin. Sen on havaittu pysäyttävän T-solujen solusyklin G1-vaiheeseen. Lisäksi *F. nucleatum* inhiboi immuunivasteen toimintaa kasvainkudoksessa. Mekanismi perustuu *F. nucleatum*in erittämiin lyhytketjuisiin rasvahappoihin ja peptideihin. Ne vetävät puoleensa luuytimen vaimentajasoluja (Myeloid derived suppressor cell), jotka vaimentavat voimakkaasti T-solujen toimintaa kasvainkudoksessa. (Shang & Liu, 2018) Nämä solut on yhdistetty syöpäkasvainten huonoon ennusteeseen ja resistenssiin erilaisille hoidoille eikä niitä esiinny terveiden ihmisten elimistössä. Ne interaktioi T-solujen, dendriittisolujen, makrofagien ja tappajasolujen kanssa ja säätelevät niiden toimintaa. Näitten solujen lisäksi *F. nucleatum*iin yhdistetyissä kasvaimissa on huomattava määrä muita immuunivastetta inhiboivia soluja kuten TAM-soluja (Tumor associated macrophages). Nämä solut myös inhiboivat T-solujen toimintaa kasvainkudoksessa. Vaikka TAM-solut ovatkin periaatteessa immuunijärjestelmään kuuluvia soluja, ne inhiboivat immuunijärjestelmän toimintaa kasvainkudoksessa. TAM-solut on yhdistetty taudin huonoon ennusteeseen. (Shang & Liu, 2018)

Fap2 on toinen *F. nucleatum* virulenssitekijä, joka on yhdistetty immuunivasteen vaimentamiseen kasvainkudoksessa. Se on galaktoosille sensitiivinen adheesioproteiini. Se heikentää immuunivastetta vaikuttamalla TIGIT-reseptoriin, joka on T-solujen ja tappajasolujen reseptori. TIGIT on inhibitorinen immunoreseptori ja sitoutuminen tähän reseptoriin estää immuunivasteen toiminnan kasvainkudoksessa jota *F. nucleatum* kolonisoit. Tämän seurauksena sekä bakteeri että kasvainkudos välttävät elimistön immuunivasteen bakteerin inhiboidessa immuunipuolustuksen toimintaa. Fap2 inhiboi tappajasolujen sytotoksista vaikutusta. Lisäksi Fap2 on yhdistetty lymfocyttien solukuolemaan. (Shang & Liu, 2018)

F. nucleatum lisää suoliston epiteelisolujen jakautumista, muodostaa kasvaimen kehittymistä suosivan tulehdusreaktion ja inhiboi voimakkaasti immuunipuolustuksen toimintaa kasvainkudoksessa. Täten *F. nucleatumilla* on melko voimakkaita karsinogeenisiä vaikutuksia ja selkeä yhteys suolistosyöpien kehittymiseen. Kuitenkin sen tarkempi yhteys sen kolonisoiman kudoksen ja solun epigenetiikkaan vaatii lisää tutkimuksia.

6.1 *Bacterioides fragilis*

Bacterioides fragilis on anaerobinen gram-negatiivinen bakteeri, joka on osa suoliston normaaliflooraa, mutta se voi aiheuttaa esimerkiksi sepsistä päästessään ihmisen verenkiertoon. *Bacterioides fragilixen* ETBF-kanta (Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis) on yhdistetty suolistosyöpien kehittymiseen ja voimistavan terveen kudoksen muuttumista polyypin kautta kasvainkudokseksi. (Bao ym. 2019) Mekanismi miten *B. Fragilis* vaikuttaa kasvainsolukon kehittymiseen ei tunneta vielä kovin hyvin. Tiedetään että se hajottaa E-cadherin-proteiineja, joka johtaa β -cateniinin kertymiseen tumassa. Lisäksi se vaikuttaa monimutkaisen tulehdukseen liittyvän immuunipuolustuksen ja paksusuolen epiteelisolujen välisen signaalintimekanismin kautta ja muuttamalla ei-koodaavan RNA:n ekspressiota. Tulehdusreaktio on ilmeisen tärkeä *B. fragilixen* karsinogeenisille mekanismeille, sillä se ei aiheuta kasvaimia eläinmalleissa, joista on poistettu tulehduksellisten signaalintireittien geenejä. (Chung ym. 2018) Toistaiseksi ole viitteitä siitä, että se suoraan vaurioittaisi isäntäsolun DNA:ta taikka vaikuttaisi genomien vakautteen jonkin muun mekanismin kautta. Eläinmalleissa ETBF indusoi voimakkaasti suolistosyöpiä erityisesti laskevan paksusuolen alueella. ETBF-kanta sisältää bft-geenin, joka koodaa *Bacterioides fragilis* Toxin-nimistä toksiniä (BFT). EBFT on tilastollisesti merkittävästi yhdistetty suolistosyöpiin, sillä noin 90 %-suolistosyöpiä sairastavilla on havaittu EBFT. (Chung ym. 2018)

6.2 BFT-toksiini

BFT-toksiini on sinkistä-riippuvainen metalloproteiinaasi. Metalloproteiinaasit ovat proteaaseja joitten katalyyttisen toimintaan liittyy jokin metalli. BFT on gamma-sekretaasin (gamma secretase) signaalin välityksestä riippuvainen toksiiini, joka sitoutuu toistaiseksi tuntemattomaan epiteelisolujen reseptoriin. Se hajottaa muun muassa E-cadherin-proteiinia, joka muodostaa epiteelisolujen välisiä liitoksia ja muodostaa komplekseja β -cateniinin kanssa. (Chung ym. 2018) E-cadherinin hajoaminen johtaa kasvaneeseen kudosten läpäisevyyteen. Tämän lisäksi E-cadheriinin hajoaminen johtaa lisääntyneeseen WNT/ β -cateniinin signalointiin solun sisällä, sillä vapaa β -cateniini sytosolissa akkumuloituu tumaan. β -cateniinin kasvanut määrä muuttaa solun geeniekspressiota toimien samalla mekanismilla kuin aiemmin mainittu B-cateniinin aiheuttaman signaloinnin vahvistus.

6.3 *B. fragilis* ja tulehdusreaktio

B. Fragilixen karsinogeeninen vaikutus perustuu vahvasti myös tulehdukseen liitettävien signaalikaskadien aktivointiin. BFT sitoutuminen tuntemattomaan epiteelisolujen reseptoriin aktivoi useita tulehduksellisia signalointireittejä, jotka ovat Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3), NF- κ B ja IL-17 kaskadit. Stat3 on transkriptiofaktori, joka säätelee useiden eri geenien ekspressiota, jotka liittyvät solun kasvuun ja jakautumiseen. Lisäksi se liittyy apoptoosin säätelyyn. BFT ei kuitenkaan yksin saa aikaan Stat3:sen aktivoitumista vaan siihen vaaditaan monimutkainen tulehduksellinen signaaliketju. BFT:n sitoutuessa paksusuolen epiteelisoluissa toistaiseksi tuntemattomaan reseptoriin, se saa aikaan Stat3:sen aktivaatiota immuunipuolustuksen soluissa, joka taas johtaa Stat3 aktivaatioon suoliston epiteelisoluissa. Tämä johtaa NF- κ B ja IL17 aktivaatioon suoliston epiteelisoluissa, joka johtaa tulehdusreaktioon, joka voimistaa kasvainkudoksen kehittymistä. (Chung ym. 2018) Myös IL-17 interleukiini on yhdistetty kasvainten kehittymiseen. (Xia ym. 2014) Hiiret, jotka eivät kykene tuottamaan IL-17:aa tai niiltä puuttuu IL-17 reseptori ovat vastustuskykyisiä ETBF:n aiheuttamalle karsinogeesille. (Chung ym. 2018) IL-17 on siis tärkeä tulehduksellinen tekijä ETBF:n aiheuttamassa karsinogeesissä ja tämä korostaa immuunipuolustuksen ja tulehduksen roolia erilaisten kasvainten kehittämisessä. Vaikka tämä mekanismi toimii koko paksusuolen matkalta, laskevan paksusuolen alueella karsinogeeninen vaikutus on erityisen voimakas. Eläinmalleissa laskevan paksusuolen kohdalla NF- κ B signaloinnin aktivoituminen ja erilaisten kemokiinien tuotto on voimakkaampaa. Tämä johtaa myös siihen, että polyypit ja

kasvainet keskittyvät laskevan paksusuolen alueelle. Syy ilmiölle on toistaiseksi tuntematon. (Chung ym. 2018)

6.4 *B.fragilis* ja pitkä ei-koodava RNA

ETBF on yhdistetty paksusuolen syöpään myös pitkän ei-koodaavan RNA:n (long non-coding RNA) käytöksessä tapahtuneiden muutosten kautta. ETBF saa aikaan kasvanutta BFA1L (Bacteroides fragilis-associated long non-coding RNA1) ekspressiota. (Bao ym. 2019) ETBF:ään yhdistettyjen kasvainkudoksen on havaittu ekspressoivan tätä RNA-juostetta. Pitkä ei-koodaava RNA on yhdistetty lukuisten eri solutason prosessien säätelyyn, kuten solun ja kudoksen erilaistumiseen, solun jakautumiseen, apoptoosiin, karsinogeneesiin ja geeniekspression säätelyyn. (Bao ym. 2019) Pitkä ei koodaava RNA ei siis koodaa mitään proteiinia, mutta se säätelee solun prosesseja muilla tavoilla. BFA1L:n on havaittu aktivoivan RHEB (Ras homolog enriched in brain). Se sitoutuu miR-155-5p-mikroRNA:han ja miR-200a-3p-mikroRNA:han joka johtaa kasvaneeseen RHEB ekspressioon. (Bao ym. 2019) Normaalisti nämä mikroRNA:t hiljentäisi RHEB-ekspressiota, mutta niiden toiminta inhiboituu BFA1L sitoutuessa niihin. Tämä johtaa kasvaneeseen RHEB/Mtor signaalikaskadin aktivoitumiseen. Mtor signaalikaskadi säätelee solun jakautumista, liikkuvuutta, transkriptiota ja solukuolemaa ja sen virheellinen aktiivisuus on yhdistetty useisiin erilaisiin syöpäsairauksiin. (Bao ym. 2019) Tutkimuksissa BFA1L on havaittu aiheuttavan kasvanutta solunjakautumista ja voimistavan kasvainten koon suurentumista niin in vitro ja in vivo olosuhteissa. Sen inhibointi estää solunjakautumista edistävät vaikutukset. (Bao ym. 2019) Tämä viittaa siihen, että tällä RNA-juosteella on merkitystä ETBF:n indusoimalle karsinogeneesille. *B. fragilis* voi siis altistaa kudoksen metaplasialle aiheuttamalla tulehdusreaktion, muuttaen β -cateniinin käytöstä sekä muuttamalla MTOR-kaskadin toimintaa. (Bao ym. 2019)

7. Yhteenveto

On selkeitä tuloksia sen suhteen, että tietyillä bakteereilla on solutasolla karsinogeenisiä vaikutuksia ja ne alentavat kynnystä kasvainten kehittymiselle. Näillä bakteereilla on lukuisia eri mekanismeja, joilla ne voivat vaikuttaa erilaisten syöpäsairauksien kehittymiseen esimerkiksi häiritsemällä tai manipuloimalla solun signaalikaskadeja, vaimentamalla tai muuttaen immuunijärjestelmää kasvainten kehittymistä suosivaksi, voimistaen tulehduksellista ympäristöä ja vaurioittamalla solun perimää. CLB+ *E. coli* aiheuttaa suoraan mutaatioita DNA-juosteeseen tuottamiensa genotoksiinin avulla, mikä johtaa kasvaneeseen mutaatiotaakkaan.

Myös *H.pylori* voi aiheuttaa kromosomaalista epävakautta muuttamalla tumasukkuloiden toimintaa. *H. pylori*, *F. nucleatum* ja *B. fragilis* muuttavat erilaisten signaalikaskadien toimintaa, joka johtaa voimistuneeseen solunjakautumiseen ja apoptoosin hiljenemiseen. Samaan aikaan ne inhiboivat immuunipuolustuksen toimintaa, joka suojelee kasvainkudosta immuunivasteelta. Lisäksi bakteerien aiheuttamalla tulehdusreaktiolla on suuri rooli syöpäsairauksien kannalta sillä tulehdus saa aikaan kasvainten kehittymistä voimistavan ympäristön. Tulehdusta voimistavien signaalikaskadien inhibointi usein hidastaa tai pysäyttää kasvainten kehittymisen.

Kuitenkin aiheen saralla on paljon kysymysmerkkejä. Kuten esimerkiksi se mikä on koko mikrobiomin rooli taudin kehittymisessä, sillä suolistossa on runsaasti erilaisia bakteereja tai miten potentiaalisesti karsinogeeniset bakteerit vaikuttavat muuhun mikrobiomiin. Lisäksi miten ulkoiset tekijät kuten ruokavalio, ympäristö taikka antibiootit vaikuttavat ruoansulatuselimistön mikrobiomiin ja sen mahdollisesti karsinogeenisiin bakteerikantoihin. Lisäksi mekanismit, joilla bakteerit vaikuttavat kasvainten kehittymiseen vaativat parempaa ymmärrystä ja näitten potentiaalisesti karsinogeenisten bakteerikantojen yleisyyttä tulisi selvittää laajemmin. On kuitenkin selkeää, että ruoansulatuselimistön mikrobiomilla on vaikutusta erilaisten syöpäsairauksien kehittymiseen ja niillä saattaa olla merkitystä kansanterveyden kannalta sillä suolistosyövät ovat yksi yleisimmistä syöpäsairauksista. Siksi näiden bakteerien roolia syöpäsairauksien kehittymisessä on syytä ymmärtää paremmin. On myös mahdollista, että suoliston mikrobiomin koostumuksen selvittämisellä tai biopsioita sekvensoimalla voitaisiin kehitellä diagnostiikkaa ja hoitoja, mikäli bakteeritulehdus voitaisiin identifoida kasvainten kehittymistä ajavaksi tekijäksi.

Viittaukset

- Bao, Y., Tang, J., Qian, Y., Sun, T., Chen, H., Chen, Z., Sun, D., Zhong, M., Chen, H., Hong, J., Chen, Y., & Fang, J.-Y. (2019). Long noncoding RNA BFAL1 mediates enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-related carcinogenesis in colorectal cancer via the RHEB/mTOR pathway. *Cell Death & Disease*, 10(9), 675.
- Brennan, C. A., & Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 156–166.
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., & Bonnet, R. (2013). High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS One*, 8(2), e56964–e56964.
- Butt, J., & Epplein, M. (2019). *Helicobacter pylori* and colorectal cancer—A bacterium going abroad? *PLoS Pathogens*, 15(8), e1007861–e1007861.
- Chung, L., Thiele Orberg, E., Geis, A. L., Chan, J. L., Fu, K., DeStefano Shields, C. E., Dejea, C. M., Fathi, P., Chen, J., Finard, B. B., Tam, A. J., McAllister, F., Fan, H., Wu, X., Ganguly, S., Lebid, A., Metz, P., Van Meerbeke, S. W., Huso, D. L., ... Housseau, F. (2018). *Bacteroides fragilis* Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe*, 23(2), 203–214.e5.
- Dalmaso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., & Bonnet, R. (2014). The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes*, 5(5), 675–680.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Ballan, G., Loizzo, S., & Fiorentini, C. (2013). The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators. *Toxins*, 5(8), 1462–1474.
- Francescone, R., Hou, V., & Grivennikov, S. I. (2014). Microbiome, inflammation, and cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 20(3), 181–189.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74–88.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Huber, A. R., Hoeck, A. van, Wood, H. M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P. B., Paganelli, F. L., Geurts, M. H., Beumer, J., Mizutani, T., Miao, Y., Linden, R. van der, Elst, S. van der, J. M. B., P, A., ... Clevers, H. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+E. coli. *Nature*, 580(7802), 269–273.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., & Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science*, 313(5788), 848 LP – 851.
- Polk, D. B., & Peek, R. M. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 10(6), 403–414.

Schwabe, R. F., & Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 13(11), 800–812.

Shang, F.-M., & Liu, H.-L. (2018). *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 10(3), 71–81.

Song, X., Xin, N., Wang, W., & Zhao, C. (2015). Wnt/ β -catenin, an oncogenic pathway targeted by *H. pylori* in gastric carcinogenesis. *Oncotarget*, 6(34), 35579–35588.

Thiele Orberg, E., Fan, H., Tam, A. J., Dejea, C. M., Destefano Shields, C. E., Wu, S., Chung, L., Finard, B. B., Wu, X., Fathi, P., Ganguly, S., Fu, J., Pardoll, D. M., Sears, C. L., & Housseau, F. (2017). The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunology*, 10(2), 421–433.

Vizcaino, M. I., & Crawford, J. M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nature Chemistry*, 7(5), 411–417.

Wilson, M. R., Jiang, Y., Villalta, P. W., Stornetta, A., Boudreau, P. D., Carrá, A., Brennan, C. A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L. D., Engelward, B. P., Garrett, W. S., Balbo, S., & Balskus, E. P. (2019). The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science*, 363(6428), eaar7785.

Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunology Research*, 2(9), 823–830.

Xue, M., Kim, C. S., Healy, A. R., Wernke, K. M., Wang, Z., Frischling, M. C., Shine, E. E., Wang, W., Herzon, S. B., & Crawford, J. M. (2019). Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science*, 365(6457), eaax2685.