

Η σημασία του μικροβίου

Διονύσης Σγούρας

Η απονομή του βραβείου Nobel Ιατρικής 2005 στους Warren και Marshall για την περιγραφή του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού (*Hp*), 22 χρόνια μετά την ανακάλυψή του αποτελεί έμμεση απόδειξη ότι το εν λόγω βακτήριο παραμένει σταθερά στο προσκήνιο του ενδιαφέροντος της διεθνούς ερευνητικής δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, διότι αποτελεί ένα εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη μηχανισμών παθογένειας που εμπλέκονται στις χρόνιες λοιμώξεις, αλλά και μηχανισμών που φαίνεται να συνδέουν τη φλεγμονή με την καρκινογένεση. Η ικανότητα του *Hp* να παρακάμπτει τους μηχανισμούς επαγρύπνησης του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος εγκαθιστώντας χρόνια λοίμωξη, με επαγωγή χρόνιας γαστρίτιδας και η αιτιολογική συσχέτιση αυτής με τη δυνατότητα επαγωγής μηχανισμών καρκινογένεσης στο γαστρικό επιθήλιο αποτελούν πεδία έντονου ενδιαφέροντος. Σε αντίθεση με άλλα παθογόνα του γαστρεντερικού των οποίων η δράση είναι ενδοκυττάρια, το *Hp* δρα μάλλον εξωκυττάρια μεταφέροντας παράγοντες παθογένειας μέσα στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών αλλά και DNA. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων παθογένειας με ενδοκυττάρια μόρια-κλειδιά που καθορίζουν την κυτταρική ομοιοστάση, δημιουργεί τις προϋποθέσεις για την επαγωγή μηχανισμών φλεγμονής και την καταστροφή του γαστρικού επιθηλίου. Είναι πλέον κοινή παραδοχή ότι η λοίμωξη από *Hp* επιφέρει χρόνια ενεργό γαστρίτιδα και συνδέεται άρρηκτα με την εμφάνιση πεπτικού έλκους. Περαιτέρω όμως, η παρουσία του συσχετίζεται ισχυρά και με τη δημιουργία συνθηκών για τη δημιουργία MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) λεμφώματος

και γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Αν και η νοσολογική έκβαση της λοίμωξης από *Επ* δεν έχει διαλευκανθεί, γίνεται ολοένα σαφέστερο ότι οι συνιστάμενοι μηχανισμοί συνδυάζουν (α) παράγοντες παθογένειας του βακτηρίου, (β) τα ιδιαίτερα γενετικά χαρακτηριστικά του ξενιστή που αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη καθώς και (γ) περιβαντολογικούς παράγοντες όπως οι διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα κ.λπ.

Παράγοντες παθογένειας

Σε ερευνητικό επίπεδο καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια για την εξιχνίαση των μηχανισμών με τους οποίους «παράγοντες παθογένειας» του *Επ* συμβάλλουν στην απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην καταστροφή του γαστρικού επιθηλίου, στη δημιουργία φλεγμονής και τελικά στην επαγωγή μηχανισμών καρκινικής εξαλλαγής. Τέτοιοι παράγοντες είναι (α) οι πρωτεΐνες BabA2 και SabA που μεσολαβούν στην προσκόλληση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα διευκολύνοντας τον αποικισμό και τη διατήρηση της λοίμωξης, (β) το νησίδιο παθογένειας cag που κωδικοποιεί το σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών τύπου IV και (γ) οι κυτταροτοξίνες CagA και VacA που μετά την είσοδό τους στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα απορυθμίζουν μηχανισμούς μεταγωγής ενδοκυττάριου σήματος και επομένως επιδρούν στην κυτταρική ομοιόσταση.

Παράγοντες προσκόλλησης (*BabA2*, *SabA*)

Αν και η πλειονότητα των *Επ* ανιχνεύονται στη βλέννη, ένας μικρός αριθμός προσκολλώνται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω των αντιγόνων των ομάδων αίματος που εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα πλέον σημαντικά από αυτά τα αντιγόνα είναι τα Lewis b των οποίων η έκφραση στο στομάχι συνδέεται με αυξημένο αποικισμό με *Επ*. Άλλα αντιγόνα, όπως τα Lewis x και τα Lewis a, επίσης συντείνουν στην αύξηση του βακτηριακού φορτίου αλλά σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό. Η προσκόλληση στα Lewis x αντιγόνα γίνεται μέσω της πρωτεΐνης SabA, αλλά το κύριο βάρος ερευνητικά εστιάστηκε στην πρωτεΐνη BabA η οποία είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στα Lewis b αντιγόνα. Η μεγάλη σημασία των Lewis b αντιγόνων στη βακτηριακή προσκόλληση υποδηλώνεται επίσης από το γεγονός ότι διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν ανθρώπινα Lewis b αντιγόνα αναπτύσσουν βαριά γαστρίτιδα και γαστρικά έλκη. Κλινικά στελέχη που έχουν το babA2 γονίδιο και εκφράζουν λειτουργική πρωτεΐνη BabA, έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων καθώς και αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση δωδεκαδακτυλικού έλκους, γαστρικής ατροφίας, εντερικής μεταπλασίας και γαστρικού αδενοκαρκινώματος.

Σύστημα έκκρισης τύπου IV (νησίδιο παθογένειας *cag*)

Το νησίδιο παθογένειας *cag* αποτελείται από περίπου 31 γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία ενός τύπου IV εκρηκτικού συστήματος, το οποίο έχει δειχθεί ότι μεταφέρει πρωτεΐνες όπως η κυτταροτοξίνη CagA (και αυτή κωδικοποιείται από το νησίδιο *cag*) μέσα στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Εκτός της CagA, το νησίδιο παθογένειας *cag* μεταφέρει και πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος του *Επ*, οι οποίες μετά την αναγνώρισή τους από το ενδοκυττάριο σύστημα επιτήρησης των Nod πρωτεϊνών, ενεργοποιούν μέσω του συστήματος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB την έκκριση χημειοτακτικών παραγόντων, κυρίως ιντερλευκίνης 8 (IL-8) από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Τέτοιοι παράγοντες κατευθύνουν την κυτταρική απόκριση έναντι της λοίμωξης, ελέγχοντας την χημειοταξία λεμφοκυττάρων και ουδετεροφίλων στο χόριο. Επιδημιολογικά η παρουσία του νησιδίου παθογένειας *cag* σε κλινικά στελέχη *Επ* έχει συσχετισθεί με περιστατικά βαρύτερης γαστρικής φλεγμονής, αυξημένης έκκρισης χημειοτακτικών κυτοκινών και γαστρικής καρκινογένεσης. Ανεξαρτήτως της δράσης του νησιδίου παθογένειας στην ενεργοποίηση των μηχανισμών φλεγμονής, ισχυρή χημειοτακτική δράση στα ουδετερόφιλα ασκεί και ένας επιπλέον παράγοντας του *Επ* η HP-NAP (*H. pylori* neutrophile activating protein) η οποία μεταφέρεται παρακυτταρικά στο χόριο.

Κυτταροτοξίνες CagA και VacA

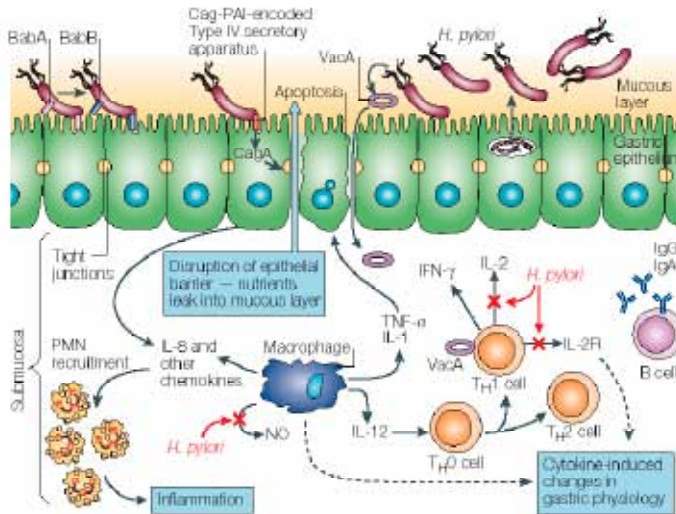
Επιδημιολογικά στοιχεία, καταδεικνύουν ότι η παρουσία σε κλινικά στελέχη κυτταροτοξινών όπως η CagA και συγκεκριμένων υποτύπων της VacA συνδέεται με αυξημένες αλλοιώσεις του γαστρικού επιθηλίου. Η μελέτη για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης παραγόντων παθογένειας του *Επ* όπως οι πρωτεΐνες CagA και VacA γίνεται κυρίως με χρήση *in vitro* κυτταρικών συστημάτων πειραματικής λοίμωξης *Επ*. Η φαινοτυπική αλλαγή τύπου-αυξητικού παράγοντα που παρατηρείται στη μορφολογία και στην κινητικότητα των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από *in vitro* *Επ* μόλυνση, γνωστή και σαν ραμφοειδής φαινότυπος (hummingbird phenotype) είναι ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα που αναδεικνύει τη βιολογική σημασία της πρωτεΐνης CagA. Η εμφάνιση των συγκεκριμένων μορφοκινητικών αλλαγών, σχετίστηκε με την ενδοκυττάρια ανίχνευση φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης CagA η οποία δρα σαν ένας απορρυθμιστικός αυξητικός παράγοντας. Η CagA αφού εισέλθει στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα φωσφορυλιώνεται από κινάσες της οικογένειας Src του κυττάρου, σε αμινοξέα τυροσίνης (Y) που περιλαμβάνονται σε επαναλαμβανόμενα πεπτιδικά μοτίβα της μορφής EPIYA (γλουταμικό-προλίνη-ισολευκίνη-τυροσίνη-αλανίνη). Ανάλογα με την πεπτιδική αλληλουχία που ακολουθεί, αυτά τα μοτίβα έχουν ορισθεί σαν EPIYA-A, EPIYA-B και EPIYA-C. Από μελέτες σε στελέχη *Επ* που προέρχονται από Δυτικούς και Ασιατικούς πληθυσμούς διαπιστώθηκε ότι η συντριπτική πλειοψηφία

(95%) των CagA-θετικών στελεχών διαθέτει 3-4 μοτίβα τύπου EPIYA στο καρβόξυ-τελικό άκρο της CagA πρωτεΐνης, σε διάταξη ABC ή ABCC. Αντίθετα, σε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 3-5% ο αριθμός των EPIYA-C μοτίβων ποικίλει από 1-4 και μάλιστα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι στελέχη *Ep*, που προέρχονται από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα, παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό επαναλήψεων της μορφής EPIYA-C στη CagA πρωτεΐνη. Επίσης, ευρήματα του εργαστηρίου μας σε σύνολο 135 και πλέον κλινικών στελεχών *Ep* από παιδιά και ενήλικες, έδειξαν ότι εμφάνιση περισσότερων των 3 επαναλήψεων της μορφής EPIYA-C διαπιστώνεται αποκλειστικά σε στελέχη που απομονώθηκαν από ενήλικες και όχι από παιδιά. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι ενδεχομένως η προσθήκη επαναλήψεων της μορφής EPIYA-C στη CagA πρωτεΐνη λαμβάνει χώρα αργότερα κατά την ενηλικίωση, γεγονός που μπορεί να εξηγήει τη διαφορετική κλινική εκδήλωση της *Ep* λοίμωξης, στις δύο αυτές ηλικιακές ομάδες. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η ύπαρξη περισσότερων μοτίβων φωσφορυλίωσης EPIYA στην CagA, και όχι το μικροβιακό φορτίο του *Ep* στο γαστρικό βλεννογόνο, σχετίζεται με το βαθμό βαρύτητας και ενεργού δραστηριότητας της αναπτυσσόμενης χρόνιας γαστρίτιδας στο άντρο ασθενών με *Ep* λοίμωξη. Η συσχέτιση αυτή είναι σημαντική στα περιστατικά δωδεκαδακτυλικού και λιγότερο γαστρικού έλκους στο δείγμα των ασθενών που εξετάσαμε. Διαφαίνεται λοιπόν ότι ένας κύριος βιολογικός ρόλος της CagA πρωτεΐνης μπορεί να είναι η μεταβολή της κυτταρικής μορφολογίας και η χαλάρωση των στενοσυνδέσμων μεταξύ των κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου. Άλλωστε έχει δειχθεί ότι η CagA αλληλεπιδρά με δύο βασικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, την ZO-1 (epithelial tight-junction scaffolding protein) και την JAM (junctional adhesion molecule) με αποτέλεσμα τον έκτοπο σχηματισμό του συμπλόκου στενοσυνδέσμων στο σημείο της βακτηριακής πρόσδεσης και αφετέρου την αλλαγή στη σύνθεση και λειτουργία του συμπλόκου των κορυφαίων συνδέσμων στα κύτταρα.

Ένας άλλος βακτηριακός παράγοντας παθογένειας του *Ep*, είναι η πρωτεΐνη VacA, η οποία παρόλο που συναντάται σε όλα τα κλινικά στελέχη *Ep*, μόνο στο 50% αυτών, προκαλεί κυτταρική καταστροφή με σχηματισμό κενοτοπίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αλληλουχία της VacA διαφέρει μεταξύ στελεχών όσον αφορά την ενδιάμεση περιοχή (m region) και την περιοχή σήματος (s region) με την ύπαρξη υποτύπων m1, m2 και s1, s2 αντίστοιχα. Από τη μελέτη των διαφορετικών υποτύπων προκύπτει ότι ο πλέον τοξικός υπότυπος είναι ο s1m1, μεσαίας τοξικότητας ο s1m2 και λιγότερο τοξικός ο συνδυασμός s2m2, ενώ υπότυπος s2m1 δεν υφίσταται. Σε συνδυασμό με το ραμφοειδή φαινότυπο που δημιουργείται από τη δράση της CagA, τα κύτταρα που μολύνονται με στελέχη *Ep* που περιέχουν πρωτεΐνη VacA με ισότυπο s1m1 παρουσιάζουν έντονα φαινόμενα δημιουργίας κενοτοπίων και απόπτωσης. Αντίθετα, επιδημιολογικές μελέτες σε κλινικά στελέχη που δεν σχετίζονται με αυξημένη γαστρική βλάβη, δείχνουν ότι η απουσία της CagA πρωτεΐνης, συνδυάζεται με την παρουσία της ανενεργού μορφής της πρωτεΐνης VacA (s2m2 υπότυπος).

Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μια συνεργική δράση των δύο παραγόντων παθογένειας για την οποία όμως δεν υπάρχει κάποια βιολογική εξήγηση. Η ενδοκυττάρια δράση της VacA είναι πολυποίκιλη καθώς μπορεί να δρα σαν ρυθμιστής (α) της λειτουργίας των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και (β) του μηχανισμού ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Η επίδραση της VacA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ταχύτερη ενεργοποίηση των παραγόντων p38/ATF-2 της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος, τον απώτερο σχηματισμό κενοτοπίων στα ενδοσώματα, την εντοπισμένη δράση στα μιτοχόνδρια με απελευθέρωση κυτοχρώματος C, και την επαγωγή φαινομένων απόπτωσης μετά από ενεργοποίηση προ-κασπασών-9 και-3, -6 και -7. Αντίστοιχα η VacA επηρεάζει στους μηχανισμούς της ανοσολογικής απόκρισης, επιδρώντας ανασταλτικά στη φαγοκυττάρωση, την αντιγονική παρουσίαση και στην ενεργοποίηση των T- λεμφοκυττάρων. Η τελευταία έχειδειχθεί ότι είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της δράσης του πυρηνικού παράγοντα NFAT, ο οποίος εκπροσωπεί μία οικογένεια συγγενών παραγόντων μεταγραφής που ελέγχουν τη συνδυασμένη έκφραση γονιδίων κυτοκινών, όπως η Ιντερλευκίνη-2. Ανεξαρτήτως του ανοσοκατασταλτικού της ρόλου έχουν παρατηρηθεί και προ-φλεγμονώδεις δράσεις της VacA, όπως η ενεργοποίηση της έκκρισης από τα μαστοκύτταρα ισχυρών χημειοτακτικών μορίων όπως του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) και της Ιντερλευκίνης-6 και από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα της κυκλοξυγενάσης-2.

Η αλληλεπίδραση παραγόντων του *Ep* και του ξενιστή συμβάλλουν στη δημιουργία της χρόνιας γαστρίτιδας και στην εγκατάσταση της λοίμωξης (Εικόνα 1). Το *Ep* προσκολλάται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω της δράσης μορίων προσκόλλησης, όπως η BabA. Τα στελέχη που διαθέτουν ένα λειτουργικό νησίδιο παθογένειας επιτρέπουν τη μεταφορά μορίων όπως της πρωτεΐνης CagA αλλά και πεπτιδογλυκανών μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την παραγωγή Ιντερλευκίνης-8 και άλλων χημειοτακτικών μορίων, που καθοδηγούν και ενισχύουν την εισβολή στο χόριο των πολυμορφοπυρήνων. Η πρωτεΐνη CagA εντοπίζεται στους κυτταρικούς στενοσυνδέσμους και με την πάροδο του χρόνου καταστρέφει την επιθηλιακή κυτταρική συνοχή, πιθανότατα προσδίδοντας στα επιθηλιακά κύτταρα ένα φαινότυπο μεσεγγυματικού τύπου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στο βλενογόνο και την εισροή της VacA στο χόριο. Η VacA μπορεί επίσης να συμβάλλει στην καταστροφή της επιθηλιακής συνοχής ενεργοποιώντας αποπτωτικούς μηχανισμούς στα επιθηλιακά κύτταρα, μέσω της μείωσης του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού, της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C, είτε της ενεργοποίησης του TNF- α . Η χρόνια φάση της γαστρίτιδας που προκαλείται από το *Ep* αποτελεί τη συνισταμένη ανοσολογική απάντηση της αρχικής απόκρισης του έμφυτου ανοσολογικού συστήματος και των μηχανισμών της επίκτητης λεμφοκυτταρικής απόκρισης. Παραγόμενες κυτοκίνες όπως η Ιντερλευκίνη 12 από μακροφάγα, ενεργοποιούν τα



Εικόνα 1. Αλληλεπίδραση παραγόντων του *Hp* και του ξενιστή (Nature Reviews in Microbiology 2004;2:747-765).

T- βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα B κύτταρα, παράλληλα όμως επηρεάζουν και τα επίπεδα παραγωγής της βλέννης, επιβάλλοντας αλλαγές στη γαστρική οξύτητα και την ομοιοστάση στο γαστρικό επιθήλιο. Παράλληλα, μέσω της δράσης της VacA μπλοκάρεται η ενεργοποίηση των T- λεμφοκυττάρων. Έτσι η συνδυασμένη δράση των CagA και VacA πρωτεϊνών φαίνεται να αποσκοπεί στην αφενός μέσω της δράσης της CagA χαλάρωση των κυτταρικών στενοσυνδέσμων και την καταστροφή της συνοχής του γαστρικού επιθηλίου και αφετέρου μέσω της δράσης της VacA στην αναστολή κύριων μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.

Σε μία χρόνια λοίμωξη είναι εξαιρετικά σημαντικό και για το μικρόβιο και για τον ξενιστή να υπάρχει ισορροπία της δράσης των παραγόντων παθογένειας και της ανοσολογικής απόκρισης. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού το *Hp* έχει δείχθει ότι περιέχει ένα πολύ ευμετάβλητο γονιδίωμα το οποίο μεταλλάσσεται αναφορικά με την ύπαρξη ή την έκφραση παραγόντων παθογένειας. Η μεταβολή αυτή γίνεται με μηχανισμούς ομόλογου ανασυνδυασμού σε τέτοιο βαθμό, ώστε ανά πάσα χρονική στιγμή να υπάρχει μία πλειάδα κλώνων ενός ή περισσότερων *Hp* στελεχών ανά ασθενή, που εκφράζουν ή όχι κάποιο παράγοντα παθογένειας. Έτσι λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας του μικροβίου, η μελέτη της αλληλεπίδρασης των παραγόντων παθογένειας και των κυτταρικών ή μη στοιχείων του ανοσοποιητικού γίνεται ακόμα πιο πολύπλοκη. Η εξιχνίαση των μηχανισμών που καθορίζουν τη γενετική ποικιλομορφία και διέπουν όλες τις αλληλεπιδράσεις με τον ξενιστή θα αναδείξει τους παράγοντες

του βακτηρίου και του ξενιστή που καθορίζουν σε σημαντικό επίπεδο την έκβαση της *Επ* λοίμωξης.

ΣΧΕΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Israel DA, Peek RM Jr. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:3-7.
2. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:449-490.
3. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:747-765.
4. Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006;208:233-248.
5. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.