

CDT toxíny

Čurová K., Kmeťová M., Siegfried L.

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie UPJŠ LF a UN LP Košice

SÚHRN

Cytoletálne toxíny (cytolethal distending toxins; CDT) sú intracelulárne pôsobiace proteíny, ktoré zasahujú do bunkového cyklu eukaryotických buniek. Sú produkované gramnegatívnymi baktériami, ktoré majú afinitu k mukokutánnym povrchom a môžu sa uplatniť v patogenéze rôznych ochorení u cicavcov. Funkčný toxín sa skladá z troch proteínov: CdtB vstupuje do jadra a svojou nukleázovou aktivitou indukuje fragmentáciu jadra a rozrušenie chromatinu, CdtA a CdtC sú zodpovedné za pripojenie toxínu k povrchu hostiteľskej bunky. Cytotoxický účinok CDT vedie k zastaveniu bunkového cyklu predtým, ako bunka vstúpi do mitózy a k ďalším zmenám (rozšírenie bunky a smrť, apoptóza), ktoré závisia

od typu bunky. CDT tak môže pôsobiť ako faktor virulencie u patogénnych baktérií, ktoré ho produkujú a prispievajú k iniciácii niektorých ochorení. Zvlášť významné sú zápalové črevné ochorenia vyvolané črevnými baktériami, periodontitída, pri ktorej sa ako etiologický agens uplatňuje *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a mäkký vred, ktorého pôvodcom je *Haemophilus ducreyi*.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

cytoletálny toxín – CDT – faktor virulencie – gramnegatívne baktérie

ABSTRACT

Čurová K., Kmeťová M., Siegfried L.: Cytolethal distending toxins

Cytolethal distending toxins (CDT) are intracellularly acting proteins which interfere with the eukaryotic cell cycle. They are produced by Gram-negative bacteria with affinity to mucocutaneous surfaces and could play a role in the pathogenesis of various mammalian diseases. The functional toxin is composed of three proteins: CdtB entering the nucleus and by its nuclease activity inducing nuclear fragmentation and chromatin disintegration, CdtA, and CdtC, the two latter being responsible for toxin attachment to the surface of the target cell. Cytotoxic effect of CDT leads to the cell cycle arrest before the cell enters mitosis and to further changes

(cell distension and death, apoptosis) depending on the cell type. Thus, CDT may function as a virulence factor in pathogenic bacteria that produce it and thus may contribute to the initiation of certain diseases. Most important are inflammatory bowel diseases caused by intestinal bacteria, periodontitis with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as the aetiological agent and ulcus molle where *Haemophilus ducreyi* is the causative agent.

KEYWORDS

cytolethal distending toxin – CDT – virulence factor – Gram-negative bacteria

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014, č. 2, s. 134–139

ÚVOD

CDT toxíny patria do rodiny bakteriálnych toxínov produkovaných gramnegatívnymi baktériami. Sú to intracelulárne pôsobiace termolabilné proteíny, ktoré ovplyvňujú bunkový cyklus eukaryotických buniek. Prvé toxické účinky filtrátov bujónových kultúr niektorých bakteriálnych kmeňov *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* a *Campylobacter jejuni* boli pozorované a bližšie popísané autormi Johnsonom a Liorom v r. 1987 [1]. Prejavovali sa zväčšovaním jadier a veľkosti buniek a viedli k predčasnému odumieraniu buniek. Na základe týchto účinkov bolo odvodené aj pomenovanie cytoletálny toxín [1, 2, 3].

VÝSKYT

Schopnosť produkovať CDT toxíny bola dokázaná u gramnegatívnych baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, u rodov *Campylobacter* a *Helicobacter*. Producenti CDT patria k patogénnej, ale aj komenzálnej mikroflóre, ktorá má primárnu afinitu k mukokutánnym povrchom a môžu sa

uplatniť v patogenéze lokalizovaných a diseminovaných infekcií u rôznych cicavcov [4].

V čeľadi *Enterobacteriaceae* sa CDT toxíny vyskytujú u baktérií, ktoré sú zodpovedné za črevné infekcie a infekcie močových ciest s možnosťou systémového šírenia: *E. coli*, *Shigella boydii* sérotyp 13, *Shigella dysenteriae* a *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérotyp Typhi (S. Typhi). V rámci druhu *E. coli* sú nositeľmi CDT rôzne humánne a zvieracie patotypy [4, 5]. Zo spektra humánnnych patotypov bola prítomnosť CDT potvrdená pri enteropatogénnych *E. coli* (EPEC) a enterotoxigénnych *E. coli* (ETEC), ktoré kolonizujú mukózu tenkého čreva a spôsobujú enterokolitídu, šigatoxín produkujúcich *E. coli* (STEC), ktoré sú príčinou hemolyticko-uremického syndrómu, extraintestinálnych patogénnych *E. coli* (ExPEC) a nekrotoxických *E. coli* (NTEC), ktoré kolonizujú mukózu urogenitálneho traktu a spôsobujú infekcie močových ciest. Medzi zvieratami bola prítomnosť CDT potvrdená pri vtáčích patogénnych *E. coli* (APEC) a ExPEC izolovaných od kurciat, pri NTEC izolovaných od dobytka a prasiat. Miestom kolonizácie všetkých týchto zvieracích patotypov bola mukóza tenkého čreva, ktorá

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

viedla k rozvoju enterokolitídy, resp. septikémie. Šigely a salmonely produkujúce CDT boli izolované u človeka, kde kolonizujú mukózu tenkého čreva a spôsobujú závažné črevné ochorenia, dyzentériu a brušný týfus [4, 6, 7]. Najnovšie výskumy potvrdili prítomnosť CDT aj u *Providencia alcalifaciens*, ktorá bola izolovaná od pacientov s hnačkou [8].

V rámci čeľade *Pasteurellaceae* boli CDT potvrdené u druhov *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus parasuis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (predtým *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). *H. ducreyi* je humánny patogén spôsobujúci pohlavne prenosné ochorenie, označované ako *ulcus molle* (mäkký vred) [9]. *H. parasuis* je komenzálom v horných dýchacích cestách u prasidiat, býva asociovaný so septikémiou [10]. *A. actinomycetemcomitans* je agens, ktorý sa u ľudí podieľa na iniciácii chronickej periodontitídy a lokalizovanej agresívnej periodontitídy [11].

Rod *Campylobacter* zahŕňa antropopatogénne aj zoopatogénne druhy, ktoré produkujú CDT: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. fetus* subsp. *fetus* a *C. fetus* subsp. *venerealis*. Všetky tieto druhy kolonizujú u ľudí mukózu tenkého čreva a prispievajú k vzniku enterokolitídy, *C. fetus* subsp. *fetus* prispieva k vzniku bakteriémie. U zvierat (primáty, dobytok, ovce, prasatá, psy, mačky, fretky, kurčatá) sú uvedené druhy bežnými komenzálmi, iba *C. fetus* subsp. *fetus* môže viesť k strate schopnosti rozmnožovať sa vďaka svojej schopnosti kolonizovať mukózu urogenitálneho traktu [1, 4, 12].

Produkcia CDT sa vyskytuje aj u niektorých druhov rodu *Helicobacter*, ktoré sú primárne spojené s enterokolitídou u ľudí aj u zvierat. Niektoré druhy spôsobujú bakteriémiu/septikémiu, hepatitídu a stratu schopnosti rozmnožovať sa. Miestom kolonizácie sú mukózne povrchy tenkého čreva, žľazových ciest a pečene. *H. cinaedi*, *H. canis*, *H. pullorum* a *H. winthamensis* boli potvrdené u ľudí aj u zvierat, *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. mastomyrinus* len u zvierat [4, 12, 13].

GÉNY KÓDUJÚCE CDT

Gény kódujúce CDT boli identifikované v roku 1994 u baktérií *E. coli* [14]. Operón, pozostávajúci z troch génov *cdtA*, *cdtB* a *cdtC*, kóduje produkciu proteínov CdtA (25,5–29,9 kDa), CdtB (29–31,5 kDa) a CdtC (20,7–21,2 kDa) [15]. Podľa niektorých štúdií sa CdtA, CdtB a CdtC zoskupujú do heterotrimérneho komplexu, ktorý predstavuje holotoxín CDT [16, 17].

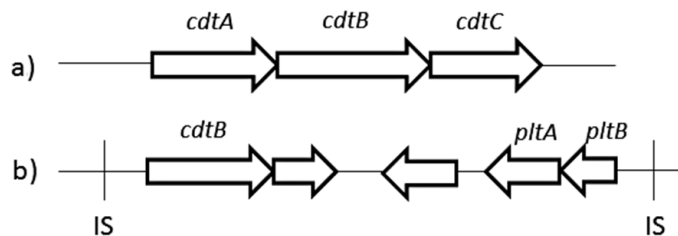
U takmer všetkých CDT produkujúcich baktérií sú gény, ktoré kódujú CDT, umiestnené na chromozóme. Ide o susediace alebo mierne sa prekrývajúce gény *cdtA*, *cdtB* a *cdtC*, ktoré spolu tvoria konštitutívne exprimovaný operón (obr. 1a).

E. coli sa významne líši od všetkých ostatných baktérií, ktoré produkujú CDT. Unikátnosť spočíva v tom, že dosiaľ bolo u tejto baktérie objavených a popísaných 5 rôznych variantov CdtB, označovaných CdtB-I – CdtB-V, pričom CdtB-I, -II, -IV a -V sú kódované chromozómovým génovým lokusom a CdtB-III dlhým konjugatívnym plazmidom pVir [5, 6, 18, 19]. U *A. actinomycetemcomitans* sa predpokladá, že *cdt* gény sú súčasťou chromozómového ostrova patogenity [20].

Takáto organizácia génov neplatí pre *Salmonella* Typhi, ktorej chýbajú gény *cdtA* a *cdtC*. Gén *cdtB* je súčasťou chromozómu, nachádza sa na ostrove patogenity, ktorý je vymedzený inzerčnými sekvenciami. Oproti *cdtB* sú umiestnené gény *pltA* a *pltB* (obr. 1b), ktorých produkty sa spájajú s CdtB pri formovaní heterotrimérneho komplexu CDT [21].

ŠTRUKTÚRA A ENZYMATICKÁ AKTIVITA

CDT je tvorený tromi podjednotkami: CdtA, CdtB a CdtC, pre úplnú aktivitu holotoxínu sú potrebné všetky tri. Pre bunkovú toxicitu indukovanú cytoletálnym toxínom bol



Obr. 1. Organizácia génov kódujúcich CDT
a) u všetkých baktérií produkujúcich CDT okrem *S. Typhi*,
b) u *S. Typhi* [upravené podľa 4]

Fig 1. Organization of the genes encoding CDT
a) in all CDT-producing bacteria except *S. Typhi*,
b) in *S. Typhi* [edited by 4]

navrhnutý AB₂ molekulárny model toxínu [16], podľa ktorého katalyticky aktívna zložka A sa prikladá k zložkám B. Zložku A predstavuje podjednotka CdtB, zodpovedná za cytotoxicitu a zložku B₂ podjednotky CdtA a CdtC, ktoré umožňujú pripojenie CDT k bunke [5].

U *S. Typhi*, ktorej chýbajú *cdtA* a *cdtC*, závisí bunková aktivita toxínu od exprese dvoch génov: *pltA* (kóduje pertussis-like toxín A, PltA) a *pltB* (kóduje pertussis-like toxín B, PltB), pretože produkty oboch génov formujú heterotrimérny komplex s CdtB. V tomto komplexe sú podjednotky PltA a PltB potrebné pre transport CDT *S. Typhi* z intracelulárneho do extracelulárneho prostredia, kde CDT pôsobí na susedné neinfikované bunky. Takýto mechanizmus predtým nebol popísaný pre žiadny AB-toxín [22, 23].

Celulárny toxický efekt u buniek intoxikovaných proteínom CDT je spôsobený aktivitou podjednotky CdtB, ktorá sa prejavuje degradáciou DNA. Zistilo sa, že katalytické zvyšky CdtB *C. jejuni* a *E. coli* sú zhodné s eukaryotickou DNázou I, čo prispelo k presvedčeniu, že táto podjednotka pôsobí ako intracelulárna DNáza. CdtB zároveň pôsobí nielen ako DNáza, ale tiež ako fosfatáza. Podľa niektorých štúdií CdtB indukuje zastavenie bunkového cyklu fosfatázovou aktivitou viac ako DNázovou, pretože sekvencie CdtB sú homologické so sekvenciami členov superrodiny metaloenzymov [23, 24].

U rôznych baktérií, ktoré produkujú CDT, vykazujú podjednotky CdtA, CdtB a CdtC rôzny stupeň podobnosti aminokyselínových sekvencií. Podjednotky CdtB majú vyšší stupeň podobnosti, CdtA a CdtC sú variabilnejšie [25].

PRODUKCIA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA

Prevalencia génov kódujúcich CDT a biologická aktivita toxínu v rámci jednotlivých bakteriálnych druhov medzi klinickými izolátmi je rozdielna. V čeľadi *Pasteurellaceae* a v rodoch *Campylobacter* a *Helicobacter* je prevalencia všeobecne vyššia ako 85%, v čeľadi *Enterobacteriaceae* je nižšia ako 14%. Zvlášť pri *E. coli* doterajšie výskumy ukazujú na nízke percento kmeňov, ktoré obsahujú operón génov *cdt*. Príčinou je pravdepodobne existencia variantov I–V, ktoré boli objavené a charakterizované len v posledných rokoch. Jedinou výnimkou medzi *E. coli* sú sorbitol fermentujúce STEC O157:H-, pri ktorých až 86,7% klinických izolátov obsahovalo gény *cdt* [4, 6].

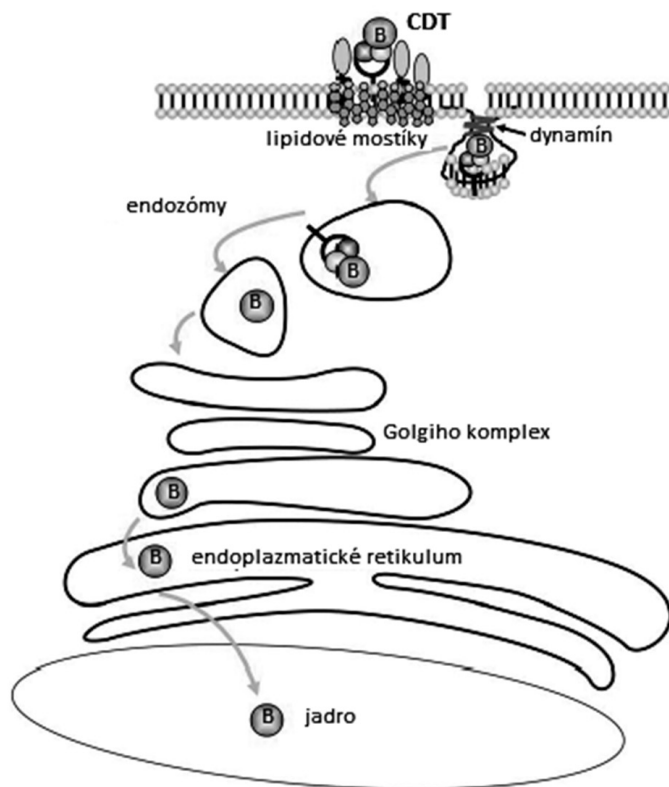
V súvislosti s rozmanitou distribúciou medzi klinickými izolátmi bola biologická aktivita CDT v rámci jednotlivých bakteriálnych druhov zistená buď v supernatante bakteriálnej kultúry (teda pravdepodobne ide o aktívnu sekréciu), alebo v bakteriálnom lyzáte alebo v oboch.

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

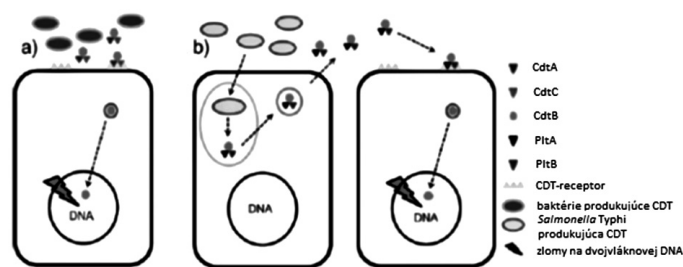
Aktivita týchto rôznych frakcií môže kolísať od relatívne vysokej, cez strednú, nízku, až po absenciu aktivity, čo môže súvisieť s patogenézou ochorenia pri jednotlivých bakteriálnych patogénoch [4]. Táto vlastnosť CDT je veľmi zaujímavá, a preto aj podrobne študovaná u *C. jejuni*. U tejto baktérie sa prítomnosť CDT potvrdila najskôr v supernatante bakteriálnej kultúry [2], neskôr v bakteriálnom lyzáte [26] a biologická aktivita toxínu u väčšiny kmeňov bola pomerne vysoká. Abououn et al. poukázali na skutočnosť, že niektoré kmene *C. jejuni* napriek prítomnosti génov nevykazovali žiadnu biologickú aktivitu [27]. Podľa najnovších výskumov CDT toxíny prítomné v supernatante bakteriálnej kultúry boli úzko spojené s vezikulami vonkajšej membrány. V súvislosti s črevnou infekciou má toto spojenie svoj význam, keďže môže slúžiť ako ochrana proti natráveniu enzýmami, čo umožňuje vychytávanie intaktného toxínu enterocyty hostiteľa [4, 28].

INTERNALIZÁCIA CDT DO JADRA

Nároky holotoxínu na absorpciu a intracelulárny transport v hostiteľskej bunke a jeho bunková toxicita vytvárajú dynamický vzťah, ktorý bol popísaný u druhov *A. actinomycetemcomitans*, *C. jejuni*, *E. coli* CdtB-I a -II a *H. ducreyi*. U týchto patogénov sa podjednotky CdtA a CdtC spájajú s mikrodoménami lipidových mostíkov, ktoré sú umiestnené na membráne hostiteľskej bunky a sú bohaté na cholesterol/sfingomyelín [14, 16, 29].



Obr. 2. Absorpcia CDT a intracelulárny transport v bunkách cicavcov [30]
Fig 2. CDT uptake and intracellular transport in mammalian cells [30]



Obr. 3. Interakcia CDT s hostiteľskými bunkami cicavcov
 a) u všetkých baktérií produkujúcich CDT okrem *S. Typhi*,
 b) u *S. Typhi* [4]

Fig 3. Interaction of CDT with mammalian host cells
 a) in nearly all CDT-producing bacteria except *S. Typhi*,
 b) in *S. Typhi* [4]

CDT je prvý bakteriálny proteín – toxín, o ktorom je známe, že pôsobí v jadre cieľovej bunky. Predpokladom pre intoxikáciu je pripojenie k plazmatickej membráne, prechod cez membránu a vstup do jadra hostiteľskej bunky. Cesta internalizácie bola podrobne preštudovaná u CDT *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans* a *E. coli* [30]. Výskumy s CDT *H. ducreyi* a HeLa bunkami poukázali na to, že CDT sa včleňuje do endozómov endocytózou, ktorá si vyžaduje pôsobenie dynamínu. Podjednotka CdtB ďalej prechádza do Golgiho komplexu, potom je transportovaná do endoplazmatického retikula (ER) a odtiaľ pravdepodobne priamo translokovaná do jadra, kde vykazuje genotoxickú aktivitu (obr. 2, 3a). K translokácii z ER do jadra nie je potrebná degradácia a rozklad proteínu, na rozdiel od väčšiny toxínov [31]. Prítomnosť podjednotky CdtB v cytoplazme intoxikovaných buniek sa nepodarilo dokázať, čo len podporuje hypotézu o priamej translokácii CDT z ER do jadra [32].

S. Typhi využíva odlišnú cestu internalizácie. Po vstupe do hostiteľskej bunky sa baktéria stáva súčasťou vakuoly, čo vedie k súčasnej expresii CdtB, PltA a PltB. Tieto podjednotky sa zostavujú do funkčných holotoxínových komplexov. Komplexy sú zbalené do transportných vezikúl, určených pre extracelulárnu sekréciu a intoxikáciu infikovaných aj susedných ešte neinfikovaných hostiteľských buniek (obr. 3b). Absencia receptora pre CDT *S. Typhi* v infikovaných hostiteľských bunkách je považovaná za ochranný mechanizmus proti cytotoxicite, ktorý umožňuje baktérii prežiť vnútri bunky a tým aj perzistovať v infikovaných tkanivách [21, 30].

VPLYV CDT NA BUNKOVÝ CYKLUS

Označenie genotoxín pre CDT je odvodené z výskumov, pri ktorých sa zistilo, že CdtB pôsobí v podmienkach *in vitro* ako DNáza [33], indukuje fragmentáciu jadra a rozrušenie chromatinu po transfekcii v kultúrach buniek cicavcov alebo *Saccharomyces cerevisiae* [34] a napokon indukuje fragmentáciu DNA v bunkách intoxikovaných exogénne pridaným CDT [35].

Účinok CDT sa prejavuje narušením integrity genómu hostiteľskej bunky a indukciou odpovede, ktorá smeruje k oprave lézií DNA a prežitiu bunky. Na základe DNázovej aktivity CDT dochádza k sérii komplexných mechanizmov, ktoré predstavujú odpoveď na poškodenie DNA (DNA damage responses, DDR). Tieto mechanizmy pôsobia tak, že opravujú genóm a minimalizujú možnosť letálneho či trvalého poškodenia genómu. Bunkový cyklus eukaryotických buniek, na ktoré pôsobí CDT, sa zastavuje v G1, S alebo G2 fáze, bunka tak nemôže vstúpiť do poslednej fázy

bunkového cyklu, ktorou je mitóza. Ak oprava lézií DNA nie je úspešná, dochádza buď k postupnému zväčšovaniu a rozširovaniu hostiteľskej bunky a následnej smrti, alebo sa v krátkom čase po intoxikácii aktivujú mechanizmy smerujúce k apoptóze. Závisí to od typu bunky. Vo všeobecnosti platí, že intoxikácia buniek nehematopoetického pôvodu toxínom CDT vedie k zastaveniu bunkového cyklu v rôznych fázach a apoptóza je pozorovaná veľmi neskoro. Časový interval, v ktorom dochádza k apoptóze, je často dlhší ako 96 hodín po intoxikácii. Hematopoetické bunky (najmä T a B lymfocyty aj bunky myeloidnej línie) po intoxikácii veľmi rýchlo podliehajú apoptóze [4, 23].

Podľa Heywood et al. pôsobí CDT na bunkový cyklus eukaryotických buniek mechanizmom, pre ktorý sú charakteristické tieto znaky:

- inhibícia proliferácie epitelových buniek a apoptóza, ktorá podporuje invazivitu baktérií;
- inhibícia proliferácie imunitných buniek, s následkom navodenia lokálnej imunosupresie;
- inhibícia fibrotickej odpovede, ktorá podporuje šírenie invadujúcich baktérií [15].

CDT AKO FAKTOR VIRULENCIE

Produkcia CDT môže zohrávať dôležitú úlohu v patogenéze niektorých ochorení. Zvlášť významné sú zápalové črevné ochorenia vyvolané črevnými baktériami. Počas posledných rokov sa však do centra pozornosti dostali dve CDT produkujúce baktérie z čeľade Pasteurellaceae, *H. ducreyi* a *A. actinomycetemcomitans*. *H. ducreyi* sa uplatňuje v patogenéze ulcus molle, *A. actinomycetemcomitans* v patogenéze periodontitídy. U všetkých týchto baktérií, izolovaných pri uvedených ochoreniach, bola zistená prítomnosť génov *cdt* a produkcia toxínu [4].

Črevné ochorenia

Niektoré baktérie produkujúce CDT, ako *C. jejuni* a *H. hepaticus*, sú spojené s gastroenteritídou. V posledných rokoch bolo dokázané, že chronický zápal je spojený so zvýšeným rizikom vzniku nádoru, pričom najlepšie preštudovaným modelom je kolorektálny karcinóm. Je pravdepodobné, že v prípade opakovanej bakteriálnej infekcie, ktorá má za následok vznik perzistentného zápalu, produkcia genotoxínov v asociácii s genetickými faktormi hostiteľa prispieva k nestabilite genómu a vzniku nádoru a/alebo k jeho progresii. *H. pylori* sa podieľa na iniciácii rakoviny žalúdka (je to karcinogén typu I). Postupne pribúdajú dôkazy o tom, že aj ďalšie druhy helikobakterov môžu byť spojené so vznikom chronických ochorení pečene, vrátane chronickej hepatitídy, chronickej cholecystitídy a cholangiokarcinómu [23, 30]. K zisteniu úlohy CDT pri chronických infekciách a zápaloch sa využívajú rôzne zvieracie modely, napr. laboratorné myši, infikované baktériami produkujúcimi CDT. Takýmto spôsobom boli uskutočnené výskumy s CDT *C. jejuni* a *H. hepaticus*. Výsledky týchto výskumov poukazujú na CDT ako na významný faktor virulencie, ktorý prispieva k invazivite črevných baktérií a aktivuje prozápalovú odpoveď. Následkom môže byť chronický zápal, respektíve progresia zápalu k malignej transformácii. CDT je jediný známy faktor virulencie produkovaný druhmi *H. hepaticus* a *H. bilis*, ktorý u chronicky infikovaných myší vedie k vzniku zápalu a karcinómu pečene a hrubého čreva [36, 37]. Hickey et al. poukázali na to, že všetky tri podjednotky CDT *C. jejuni* podporujú sekréciu interleukínu 8 (IL-8), ktorý je dôležitým mediátorom zápalu, z črevných epitelových buniek [38]. Zápal gastrointestinálneho traktu je tak pravdepodobne hlavným znakom intoxikácie toxínom CDT. Pri zápale po poškodení mikrokľvov epitelových buniek sa znižuje

ochranná funkcia črevného epitelu a stráca sa schopnosť absorbovať živiny [39]. Výsledky výskumov na myšiach s CDT mutantnými baktériami *H. hepaticus* tiež potvrdzujú, že CDT prispieva k vytváraniu lézií [15].

Úloha, akú zohráva CDT u *E. coli*, nie je celkom jasná. V prípade STEC sa potvrdzuje predpoklad, že CDT pôsobí v kombinácii s inými toxínmi. Výskumy STEC, izolovaných od pacientov s hemolyticko-uremickým syndrómom, vodnatou hnačkou a od asymptomatických pacientov, poukazujú na výskyt CDT 86,7% medzi sorbitol fermentujúcimi *E. coli* O157:H-, ktoré súčasne obsahujú gény kódujúce šigatoxín 2 a intimín. U sorbitol nefermentujúcich kmeňov *E. coli* O157:H7 bol výskyt CDT len 6% [6]. Štúdie klinických kmeňov izolovaných zo stolice pri hnačkách poukázali na to, že gény *cdt* boli prítomné len u 0,5–3,1% kmeňov. V porovnaní s nehnačkovými kmeňmi, kde bol výskyt *cdt* 0,5–1%, je síce percento výskytu vyššie, ale nepoukazuje na výraznú asociáciu s hnačkovými ochoreniami [40, 41, 42]. CDT pozitívne kmene *E. coli* boli okrem toho potvrdené pri neonatálnej bakteriálnej meningitíde a infekciách močových ciest. Tieto zistenia navrhujú, že *E. coli* produkujúce CDT môžu pôsobiť ako oportunistické patogény bez akéhosi upriamania na črevnú infekciu. Aj v týchto prípadoch sa predpokladá, že CDT nepôsobí samostatne, ale v kombinácii s inými toxínmi *E. coli*, napríklad enterotoxín, cytotoxický nekrotizujúci faktor typu 2 [41, 43].

Dôkaz o tom, že CDT zohráva úlohu v patogenéze hnačky, priniesol experiment, pri ktorom bol operón *cdt* *Shigella dysenteriae* naklonovaný do nehnačkového rekombinantného kmeňa *E. coli*. U malých cicajúcich myši došlo v priebehu 24 hodín ku vzniku hnačky. V porovnaní s inými baktériami produkujúcimi CDT sú u *Shigella* sp. výskumy zriedkavé, preto nie je známy výskyt CDT [5, 44].

U *S. Typhi* sa predpokladá, že CdtB môže byť významný pri vzniku perzistentných infekcií, ktoré sú spôsobené imunosupresívnym účinkom [21]. Narušenie črevnej mikroflóry a chronická infekcia touto baktériou predstavujú faktory, ktoré sú spojené so zvýšeným rizikom rozvoja karcinómu hrubého čreva a cholangiokarcinómu. Chronický zápal sa považuje za kľúčový moment bakteriálnej onkogenézy, pretože indukuje oxidačný stres, ktorý prispieva k poškodeniu DNA infikovaných buniek [45, 46].

V centre pozornosti mnohých súčasných výskumných prác je zistiť, či baktérie majú schopnosť podporiť proces rozvoja nádorov tým, že produkujú genotoxíny, ktoré priamo indukujú poškodenie DNA. Jednoznačná odpoveď zatiaľ stále chýba. Zástancovia tejto tézy poukazujú na určité vlastnosti, ktoré sú spoločné pre známe karcinogény aj CDT. Sú to: indukcia nestability genómu, zmeny v mechanizmoch DDR, prekonanie bariéry vedúcej k rozvoju karcinogenézy (chýba starnutie buniek), konštitutívna aktivácia signálov prežitia a progresie nádoru (nekoordinovaný rast). Chronická infekcia baktériami produkujúcimi CDT teda môže zohrávať úlohu v možnej malignej transformácii buniek a výsledky výskumov poskytujú molekulárny dôkaz typu genetických a funkčných alterácií, ktoré môžu byť do procesu karcinogenézy zapojené [46, 30].

Ulcus molle

H. ducreyi je príčinou pohlavne prenosného ochorenia, označovaného ako ulcus molle, s výskytom hlavne v tropických oblastiach. Ochorenie sa prejavuje tvorbou bolestivých vredov na genitáliách a v ich okolí [47]. Účasť CDT pri tvorbe vredov bola zistená na králičom modeli mäkkého vredu, kde po intradermálnej inokulácii *H. ducreyi* produkujúceho tento toxín bolo pozorované signifikantné zhoršenie zápalových lézií indukovaných baktériami a vznik vredu [48]. CDT *H.*

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

ducreyi ovplyvňuje proliferáciu buniek a prežívanie mnohých typov buniek zapojených do hojenia rán (fibroblasty, keratinocyty, bunky epitelového pôvodu). Môže tiež zasahovať do angiogenézy, pretože CDT ovplyvňuje proliferáciu normálnych ľudských mikrovaskulárnych endotelových buniek a endotelových buniek pupečníkovej žily. Okrem toho CDT pôsobí na efektorové bunky imunitného systému: intoxikácia inhibuje proliferáciu a sekréciu IFN- γ T lymfocytmi a indukujú apoptózu B lymfocytov a dendritických buniek (DC) [49, 50]. Keďže inkubácia DC s purifikovaným CDT *H. ducreyi* má za následok pokles sekrécie cytokínov asi o 50 %, predpokladá sa imunoinhibičný účinok toxínu. Pôsobenie na DC predstavuje stratégiu, ako sa vyhnúť imunitnej odpovedi alebo ju oneskoriť. Inhibícia bunkovej proliferácie môže tiež narušiť proces hojenia rán tým, že podporuje šírenie patogéna a iniciuje tak vznik latentnej infekcie [30, 50].

Periodontitída

Periodontitída patrí medzi najčastejšie diagnostikované odontogénne patologické stavy u ľudí. Vzniká ako dôsledok endodontickej, ale aj periodontálnej infekcie a prejavuje sa zápalom a degeneráciou podporných tkanív zubov. Ide o chronické zápalové ochorenie, ku ktorého iniciácii môže ako oportúnny patogén prispievať *A. actinomycetemcomitans* [51, 52]. Tan et al. vo svojej štúdii zistili prítomnosť *A. actinomycetemcomitans* pri 90,9 % vzoriek odobraných od pacientov s agresívnou periodontitídou, gény *cdt* boli potvrdené u 33,3 % izolátov [53]. Toxický účinok CDT môže prispievať k iniciácii periodontitídy, keďže proliferácia periodontálnych buniek ligamentu a gingiválnych fibroblastov, ktoré sú kľúčovými zložkami tkaniva okolo zubov, je inhibovaná práve týmto toxínom [54]. CDT *A. actinomycetemcomitans* okrem toho inhibuje proliferáciu a spôsobuje apoptózu CD8+ a CD4+ T lymfocytov a mononukleárne bunky periférnej krvi vystavené pôsobeniu CDT sú schopné produkovať široké spektrum prozápalových cytokínov, akými sú IL-1 β , IL-6, IL-8 a IFN- γ , ale sekrécia IL-10, IL-12 a TNF- α nebola detegovaná [55, 56]. To vedie k zlyhaniu imunitného systému, ktorý by mal prostredie zuba chrániť pred atakom baktérií. Predpokladá sa, že indukcia produkcie špecifickej skupiny cytokínov vplyvom CDT *A. actinomycetemcomitans* vedie k patológii zápalu, inhibuje funkcie T lymfocytov a tým možno vytvára vhodné miesto na prežitie a proliferáciu baktérií [5, 30].

ZÁVER

Od objavenia CDT v roku 1987 pribudlo množstvo poznatkov, ktoré objasnili štruktúru toxínu, jeho enzymatickú aktivitu, genetiku, pôsobenie na bunkový cyklus a čiastočne aj mechanizmus bunkovej toxicity. Úloha, ktorú zohrávajú cytoletálne toxíny v ochoreniach vyvolaných rôznymi patogénmi produkujúcimi CDT, je pravdepodobne odlišná a v mnohých prípadoch aj stále nejasná. Minimálne u *H. ducreyi* a *A. actinomycetemcomitans* je zrejmé, že CDT sú determinantmi ochorení, pretože pôsobia antiproliferatívne a apopticky na rôzne typy buniek (bunky kože a mukózy, endotelové bunky, bunky imunitného systému). Takýmto spôsobom môžu byť zodpovedné za pomalé hojenie a chronický priebeh ulcus molle a agresívnej periodontitídy. Na druhej strane CDT nie je agens, ktorý priamo prispieva k indukcií hnačky pri akútnych črevných infekciách vyvolaných *C. jejuni*, môže však prispievať k pretrvávaniu príznakov dlhšiu dobu alebo viesť ku kolonizácii mukózných povrchov určitými črevnými patogénmi. Aj vzťah medzi patogénom produkujúcim CDT (*H. hepaticus*, *H. bilis*, *S. Typhi* a iné), karcinómom a schopnosťou CDT narušiť DNA v rôznych typoch

bunkových línií cicavcov nie je ešte dostatočne vysvetlený. Význam CDT a možnosti uplatnenia ako kofaktora pri vzniku karcinómu je potrebné ešte študovať a bližšie vysvetliť. Okrem toho je potrebné zistiť, či CDT môže byť hlavným faktorom virulencie, ktorý prispieva k patogenéze jednotlivých ochorení.

Podakovanie: Práca vznikla s podporou projektu Centrum excelentnosti PROBIO, ITMS 26220220104 (50 %) a grantu VEGA 2/0014/13 (50 %).

Literatura

1. Johnson WM, Lior H. Production of Shiga toxin and a cytolethal distending toxin (CLDT) by serogroups of *Shigella* spp. *FEMS Microbiol Lett*, 1987;48:235–238.
2. Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog*, 1988;4:115–126.
3. Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog*, 1988;4:103–113.
4. Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*, 2011;157:1851–1875.
5. Smith JL, Bayles DO. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*, 2006;32:4:227–248.
6. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L et al. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun*, 2003;71:3634–3638.
7. Čurová K, Krmetová M, Sabol M, Gombošová L, Lazúrová I, Siegfried L. Enterovirulent *E. coli* in inflammatory and noninflammatory bowel diseases. *Folia microbiologica*, 2009;54(1):81–86.
8. Shima A, Hinenoya A, Asakura M, Sugimoto N, Tsukamoto T et al. Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* strains isolated from patients with diarrhea. *Infect. and Immun*, 2012;80(4):1323–1332.
9. Abeck D, Freinkel AL, Korting HC, Szeimis RM, Ballard RC. Immunohistochemical investigations of genital ulcers caused by *Haemophilus ducreyi*. *J STD AIDS*, 1997;8:585–588.
10. Yue M, Yang F, Yang J, Bel W et al. Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. *J Bacteriol*, 2009;191:1359–1360.
11. Henderson B, Wilson M, Shar L, Ward J. M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol*, 2002;51:1013–1020.
12. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*, 2008;10:1599–1607.
13. Liyanage NP, Manthey KC, Dassanayake RP, Kuszynski CA et al. *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter*, 2010;15:98–107.
14. Scott DA, Kaper JB. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun*, 1994;62(1):244–251.
15. Heywood W, Henderson B, Nair SP. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J Med Microbiol*, 2005;54:207–216.
16. Lara-Tejero M, Galán JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun*, 2001;69:4358–4365.
17. Yamada T, Komoto J, Saiki K, Konishi K et al. Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Protein Sci*, 2006;15:362–372.
18. Tóth I, Nougayrède JP, Dobrindt U, Ledger TN et al. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2009;77:492–500.

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

19. Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML et al. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, 2010;144:100–109.
20. Doungoudomdacha S, Volgina A, DiRienzo JM. Evidence that the cytolethal distending toxin locus was once part of a genomic island in the periodontal pathogen *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* strain Y4. *J Med Microbiol*, 2007;56:1519–1527.
21. Haghighi E, Galán JE. *Salmonella* Typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:4614–4619.
22. Spanó S, Ugalde JE, Galán JE. Delivery of *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*, 2008;3:30–38.
23. Gargi A, Reno M, Blanka SR. Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally? *Front Cell Inf Microbiol*, 2012;2:124.
24. Dlakic M. Is CdtB a nuclease or a phosphatase? *Science*, 2001;291:547.
25. Lara-Tejero M, Galán JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*, 2002;10(3):147–152.
26. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, et al. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect Immun*, 1996;64(6):2070–2078.
27. Abuoun M, Manning G, Cawthraw SA, Ridley A, et al. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun*, 2005;73:3053–3062.
28. Lindmark B, Rompikuntal PK, Vaitkevicius K, Song T, et al. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol*, 2009;9:220.
29. Shenker BJ, Besack D, McKay T, Pankoski L, et al. Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. *J Immunol*, 2005;174:2228–2234.
30. Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R, Frisan T. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*, 2011;3(3):172–190.
31. Cortes-Bratti X, Chaves-Olarte E, Lagergård T, Thelestam M. Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun*, 2000;68:6903–6911.
32. Guerra L, Nemec KN, Massey S, Tatulian SA, et al. A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1793:489–495.
33. Lara-Tejero M, Galán JE. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 2000;290:354–357.
34. Hassane DC, Lee RB, Mendenhall MD, Pickett CL. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect Immun*, 2001;69(9):5752–5759.
35. Frisan T, Cortes-Bratti X, Chaves-Olarte E, Stenleröw B, et al. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol*, 2003;5:695–707.
36. Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE et al. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol*, 2011;4:22–30.
37. Ericsson AC, Myles M, Davis W, Ma L, et al. Noninvasive detection of inflammation-associated colon cancer in a mouse model. *Neoplasia*, 2010;12:1054–1065.
38. Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 2000;68:6535–6541.
39. Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun*, 1998;66:1934–1940.
40. Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Bettelheim KA, Neogi PK, et al. Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol*, 1996;34(3):3717–3719.
41. Da Silva A, da Silva Leite D. Investigation of putative *cdt* gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol*, 2002;89:195–200.
42. Marques LRM, Tavechio AT, Abe CM, Gomes TAT. Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea. *J Clin Microbiol*, 2003;41(5):2206–2208.
43. Pérès SY, Marchès O, Daigle F, Nougayrède JP, et al. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol*, 1997;24(5):1095–1107.
44. Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun*, 1997;65:428–433.
45. Touati E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H. pylori*. *Mutat Res*, 2010;703:66–70.
46. Guigüi R, Guerra L, Levi L, Stenleröw B, et al. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell Microbiol*, 2013;15(1):98–113.
47. Trees DL, Morse SA. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*: an update. *Clin Microbiol Rev*, 1995;8:357–375.
48. Wising C, Molne L, Jonsson JM, Ahlman K, et al. The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* aggravates dermal lesions in a rabbit model of chancroid. *Microbes Infect*, 2005;7(5–6):867–874.
49. Svensson LA, Henning P, Lagergård T. The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* inhibits endothelial cell proliferation. *Infect Immun*, 2002;70(5):2665–2669.
50. Xu T, Lundqvist A, Ahmed HJ, Eriksson K, et al. Interactions of *Haemophilus ducreyi* and purified cytolethal distending toxin with human monocyte-derived dendritic cells, macrophages and CD4+ T cells. *Microb Infect*, 2004;6(13):1171–1181.
51. Kováč J, Kováč D. Histopatológia a etiopatogenéza chronickej apikálnej parodontitídy – periapikálnych granulómov. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2011;60(2):77–86.
52. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol*, 2010;54:78–105.
53. Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodont Research*, 2002;37:268–272.
54. Belibasakis G, Johansson A, Wang Y, Claesson R, et al. Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. *Eur J Oral Sci*, 2002;110(5):366–373.
55. Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, et al. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. *Infect Immun*, 2001;69:5925–5930.
56. Shenker BJ, McKay T, Datar S, Miller M, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J Immunol*, 1999;162:4773–4780.

Do redakce došlo dne 30. 8. 2013.

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Katarína Čurová, PhD.

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie UPJŠ LF a UN LP
Lekárska fakulta UPJŠ
Trieda SNP 1
040 11 Košice
Slovenská republika
e-mail: katarina.curova@upjs.sk