Bakterijske spore

Ćosić, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:892597

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Josipa Ćosić

Bakterijske spore

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Goran Palijan

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Bakterijske spore

Josipa Ćosić

Rad je izrađen na Zavodu za kvantitativnu ekologiju, Odjel za biologiju

Mentor: Dr. sc. Goran Palijan, **doc.**

Kratak sažetak završnog rada
Bakterijske spore jedna su od prilagodbi bakterija na preživljavanje nepovoljnih uvjeta. U nedostatku nutrijenata bakterije formiraju dormantnu, metabolički inaktivnu i izuzetno otpornu stanicu koja čuva genetički materijal dok uvjeti ponovno ne postanu povoljni. Sporulirajuće vrste roda *Clostridium* su obligatni anaerobi te u proces germinacije i ponovnog nastanka vegetativne stanice ulaze samo u uvjetima nedostatka kisika. Upravo zbog toga svojstva smatraju se prikladnima za liječenja tumora koji sadržavaju hipoksične regije. Spore ovih vrsta unesene u organizam proklijale bi samo unutar hipoksičnih dijelova tumorskog tkiva te bi se mogle koristiti kao vektori za prijenos različitih protutumorskih lijekova.

Broj stranica: 18
Broj slika: 5
Broj literaturnih navoda: 13
Web izvor: 1
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: bakterijske spore, hipoksija, liječenje tumora, *Clostridium*

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Department of Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

Bacterial spores

Josipa Ćosić

Thesis performed at the Subdepartment of Quantitative Ecology, Department of Biology

Supervisor: Goran Palijan, PhD, **Assist. Prof.**

Short abstract

Formation of spores is one of the adaptations of bacteria for surviving unfavourable conditions. When favored nutriens are exhausted, bacteria formes dormant – a metabolically inert and an extremely resistant cell - to preserve the cell´s genetic material in times of extreme stress. Sporulating species of *Clostridium* genus are obligate anaerobes and they selectively germinate in hipoxic conditions. This ability of clostridia spores makes them suitable for cancer therapies that target hypoxic regions of tumours. Injected spores of this species germinate only in hypoxic regions of tumour tissue and they could be used as delivery vehicles for different anti-cancer drugs.

Number of pages: 18
Number of figures: 5
Number of references: 13
Web source: 1
Original in: Croatian
Key words: bacterial spores, hypoxia, cancer therapy, *Clostridium*

Thesis deposited in the Library of Department of Biology, University of Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, University of Osijek.

Sadržaj

1. Uvod **1**
2. Firmicute **3**
3. Nastanak bakterijskih spora **4**
4. Struktura bakterijskih spora **6**
5. Germinacija bakterijskih spora **8**
6. Nastanak tumora i hipoksija **9**
7. Povijest korištenja vrsta roda *Clostridium* u terapijama liječenja tumora **10**
8. *Clostridium* i DEPT (Directed enzyme prodrug therapy) **11**
9. Upotreba *Clostridium ssp.* u drugim antitumorskim terapijama **13**
9.1. *Clostridium novyi-NT* 13
9.2. *Clostridium perfringens* 14
9.3. *Clostridium acetobutylicum* 15
10. Zaključak **16**
11. Literatura **17**

1. Uvod

Mikroorganizmi mogu osjetiti promjene u svojoj okolini i na njih reagirati. Neke bakterije u uvjetima nedostatka pojedinih nutrijenata (većinom ugljika i/ili dušika) postaju pokretne kako bi pronašle povoljnije uvjete, dok druge proizvode enzime kako bi iskoristile alternativne izvore nutrijenata. Jedna od strategija preživljavanja jest i stvaranje spora što je najčešće potaknuto upravo nedostatkom nutrijenata. Bakterije formiraju dormantnu i otpornu stanicu koja će sačuvati genetički materijal u uvjetima velikoga stresa. Velik broj mikroorganizama formira spore, ali spore vrsta roda *Bacillus* i *Clostridium* su najotpornije na različite nepovoljne uvjete (web 1). Spore vrsta roda *Bacillus* i *Clostridium* u vodi ne pokazuju mjerljivu metaboličku aktivnost prema egzogenim ili endogenim spojevima te mogu preživjeti visoke temperature, UV i γ- zračenje, isušivanje, djelovanje hidrolitičkih enzima te toksične kemikalije koje brzo i efikasno ubijaju rastuće bakterije (Setlow, 2007).

Kada se u okolišu pojave povoljni uvjeti dormantna spora prolazi kroz fazu germinacije i ponovno se razvija rastuća vegetativna stanica. Germinacija bakterijskih spora važan je korak u ponovnom vraćanju sposobnosti vegetativnog rasta i stanične diobe i najčešće je potaknuta određenim nutrijentima. Njezina važnost je i u tome što upravo germinacija bakterijskih spora uzrokuje kvarenje hrane i bolesti uzrokovane pokvarenom hranom. Na sličan način germinacija spora vrste *Bacillus anthracis* uzrokuje plućni antraks dok germinacija spora vrste *Clostridium difficile* uzrokuje infekcije crijeva (Setlow, 2003).

Bez obzira na velika ulaganja u prevenciju i liječenje, tumor jest i ostaje najveći uzrok smrti diljem svijeta. Radi toga potrebne su učinkovitije i pristupačnije terapije za njegovo liječenje. Potencijalno rješenje je uporaba bakterijskih spora koje formiraju vrste roda *Clostridium.* Njihova upotreba temelji se na tome da intravenozno unesene spore obligatnih anaerobnih bakterijskih vrsta roda *Clostridium* ulaze u proces germinacije unutar hipoksičnih ili nekrotičnih regija prisutnih samo unutar tumora i nigdje drugdje u organizmu (Kubiak i Minton, 2015).

Iako hipoksija unutar tumora povećava otpornost na radioterapijske i kemoterapijske tretmane i povećava mogućnost nastanka metastaza, ti uvjeti predstavljaju idealan okoliš za germinaciju i rast obligatnih anaerobnih bakterija. Iako hipoksični i anoksični uvjeti prevladavaju i drugdje u tijelu, kao što su crijeva, intravenozno unese spore krvlju dospijevaju samo do tkiva, odnosno stanica, ali ne dolazi do njihova izlučivanja u šupljine u tijelu. Radi toga se intravenozno unesene spore vrsta roda *Clostridium* raširе cijelim tijelom, ali do germinacije i dijeljenja dolazi samo u onim stanicama i tkivima u organizmu gdje se susretnu s hipoksičnim uvjetima. Ova predispozicija čini ih idealnim vektorima za prijenos različitih protutumorskih lijekova specifično u hipoksične regije tumora (Minton, 2003).

2. Firmicute

Koljenu Firmicute pripadaju tri najvažnija roda sporulirajućih bakterija, rod *Bacillus*, *Clostridium* i *Sporosarcina*. Ove sporulirajuće bakterije međusobno se razlikuju u staničnoj morfologiji, obliku i položaju spore unutar stanice, odnosu prema kisiku i energetskom metabolizmu. Vrste roda *Sporosarcina* su isključivo aerobi, vrste roda *Bacillus* su aerobi ili faklutativni aerobi, dok su vrste roda *Clostridium* obligatni anaerobi te fermentirajuće vrste. Sve sporulirajuće vrste imaju sličnu ekologiju, jer ih se prvenstveno pronalazi u tlu. Čak i one vrste koje su patogeni čovjeka ili drugih životinja primarno su saprofitski organizmi tla i infekcija životinje je slučajna.

Vrste roda *Bacillus* rastu na mediju koji sadrži barem male količine ugljika, dok mnoge vrste proizvode hidrolitičke enzime kojima mogu razgraditi složene polimere, poput polisaharida, nukleinskih kiselina i lipida, što im omogućuje da ih koriste kao izvor ugljika. Velik broj vrsta proizvodi antibiotike, koji se u većini slučajeva izlučuju kada stanica uđe u stacionarnu fazu vegetativnog rasta i sprema se za sporulaciju.

Vrste roda *Clostridium* anaerobi su i ne posjeduju respiracijski lanac, te ATP kao izvor energije proizvode supstratnom fosforilacijom. Brojne vrste imaju sposobnost fermentacije šećera te ga prevode u maslačnu kiselinu kao glavni nusprodukt, dok druge vrste daju produkte poput acetona i butanola. Vrste koje fermentiraju celulozu najvažniji su organizmi u razlaganju celuloze u anoksičnim uvjetima. Ove vrste posjeduju celulosome, složene multienzimske komplekse, koji su smješteni na vanjskoj površini stanične stijenke. Celulosomi vežu celulozu i prevode ju u topljive produkte koji se potom prenose u citoplazmu gdje se metaboliziraju. Druga grupa vrsta roda *Clostridium* su proteolitičke te fermentiraju aminokiseline. Najčešći produkti fermentacije aminokiselina su acetat, butirat, ugljikov dioksid i vodik. Uobičajeno stanište vrsta ovog roda je tlo, s tim da postoje vrste koje nastanjuju probavni trakt sisavaca u kojem također prevladavaju anoksični uvjeti.

Rod *Sporosarcina* odlikuje posebna karakteristika formiranja spora kuglastoga, a ne štapićastoga oblika. Vrste su kuglastoga oblika i dijele se tako da formiraju kolonije od četiri,

osam ili više stanica. Najpoznatija vrsta je *Sporosarcina ureae.* Ova vrsta katabolizira ureu do ugljikovog dioksida i amonijaka, po čemu je i dobila ime (Madigan i sur., 2015).

3. Nastanak bakterijskih spora

Modelni bakterijski organizam koji je najviše korišten za proučavanje spora jest vrsta *Bacillus subtilis,* i na tom modelu ću objasniti proces formiranja bakterijskih spora. Najčešći uzrok sporulacije jest gladovanje. Najvjerojatnije je da bakterijska stanica može osjetiti velik broj vanjskih i unutarnjih signala koji potom mogu dovesti do započinjanja procesa sporulacije (Slika 1.) (Errington, 2003).

Sporulacija zahtijeva promjenu u sintezi proteina što se postiže aktivacijom nekoliko obitelji gena, specifičnih za sporu. Proteini kodirani ovim genima kataliziraju slijed procesa koji pretvaraju hidratiziranu, metabolički aktivnu, vegetativnu stanicu u dehidratiziranu, metabolički inaktivnu, izuzetno otpornu sporu (Madigan i sur., 2015).

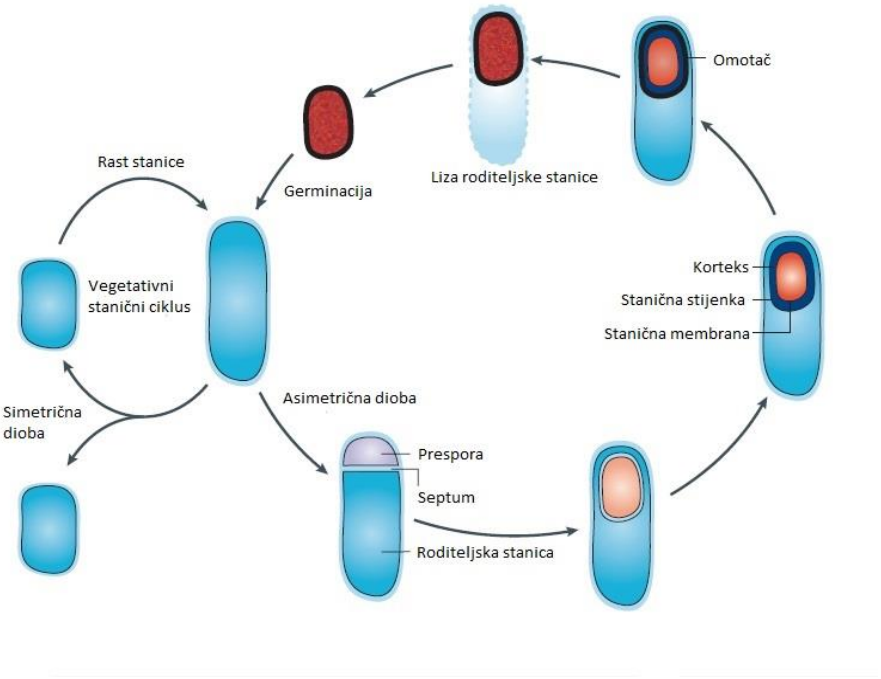
Proces sporulacije započinje fosforilacijom Spo0A proteina, koji je istodobno i aktivator i represor ekspresije gena. Spo0A potiče transkripciju spoIIA, spoIIE i spoIIG gena. Isto tako potiče ekspresiju gena koji kodiraju dva sigma (σ^F i σ^E) faktora koji asociraju s RNA polimerazom i utječu na njezinu specifičnost. Potom dolazi do nejednake podjele stanice što rezultira nastankom velike roditeljske stanice i manje prespore. To je izmijenjena verzija stanične diobe vegetativne bakterijske stanice. Stanična dioba bakterijskih stanica odvija se pomoću FtsZ faktora, koji je bakterijski homolog za tubulin. FtsZ polimerizira tvoreći protofilamente koji na mjestu dijeljenja tvore strukturu nazvanu Z-prsten. Tijekom sporulacije povećana akumulacija FtsZ faktora i sinteza SpoIIE proteina dovode do pomicanja Z-prstena iz sredine stanice i njegova razdvajanja u dva prstena, koji se smještaju blizu polova stanice. Z-prstenovi blizu polova najčešće su nejednaki te jedan od njih formira septum, što dovodi do nastanka roditeljske stanice i prespore.

Asimetrična podjela stanice dovodi i do promjena prilikom podijele kromosoma. Prvo segment kromosoma koji se nalazi u blizini oriC regije tvori kompleks sa Spo0J proteinom i

približi se polovima stanice. Kombiniranim djelovanjem Soj i Rac A proteina oriC regija veže se za DivIVA protein preko kojega se usidri na polu stanice.. Kako se formira sporulacijski septum tako se otprilike trećina kromosoma zarobi u malom odjeljku prespore. Ostatak kromosoma, koji je udaljen od oriC regije, prenosi se kroz septum pomoću DNA transportera nazvanog SpoIIIE.

Nastanak asimetričnog septuma ključan je korak u daljnjem procesu sporulacije. Njegov nastanak pokreće kaskadu promjena u genskoj ekspresiji između prespore i roditeljske stanice. Dva sigma faktora, σ^F i σ^E, sintetiziraju se na samom početku sporulacije, ali se zadržavaju u inaktivnom obliku sve dok se ne formira septum. Nakon formiranja septuma također dolazi i do sinteze dodatnih σ faktora. σ^F faktor aktivira se prvi te zajedno sa σ^G faktorom upravlja genskom ekspresijom u prespori. Odmah nakon aktivacije σ^F faktora u prespori, σ^E faktor aktivira se u roditeljskoj stanici te zajedno sa σ^K faktorom upravlja njezinom genskom ekspresijom.

Sporulacija se nastavlja degradacijom stanične stijenke unutar septuma. Potom stanična membrana roditeljske stanice obavija presporu tako da ona postaje slobodni protoplast koji je obavijen s dvije obrnute membrane. Niskomolekularni proteini sintetiziraju se u velikim količinama unutar prespore te asociraju s DNA kako bi ju zaštitili od oštećenja. Sinteza peptidoglikanskog korteksa između unutarnje i vanjske membrane prespore povezana je sa smanjenjem volumena prespore i smanjenjem količine vode te smanjenja pH unutar njezinog protoplasta. Velika količina piridin-2,6-dikarboksilne kiseline (dipicolinic acid, DPA) sintetizira se u roditeljskoj stanici te se prenosi u presporu zajedno s dvovalentnim kationima (najčešće Ca^{2+}), što dovodi do dehidracije i mineralizacije spore. Također, dolazi i do formiranja modificirane stanične stijenke izvan unutarnje stanične membrane prespore. Na kraju se oko korteksa formira proteinski omotač pomoću proteina sintetiziranih unutar roditeljske stanice. U nekih vrsta bakterija koje formiraju spore postoji još jedan dodatni sloj nazvan egzosporium koji obavija proteinski omotač. Na kraju dolazi do lize roditeljske stanice i otpuštanja spore u okoliš (Errington, 2003).

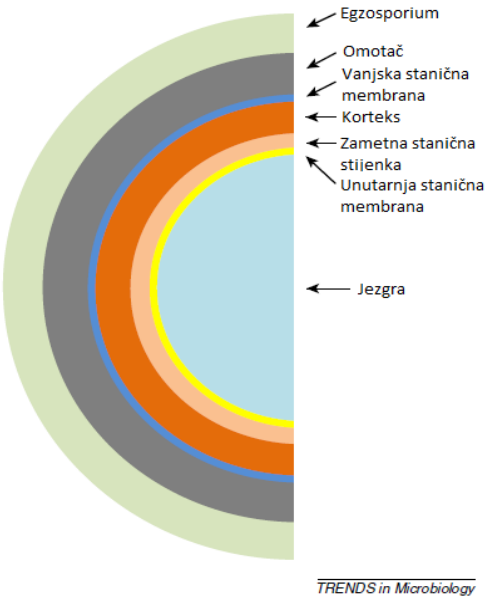


Slika 1. Proces nastanka spora vrste *Bacillus subtilis*

4. Struktura bakterijskih spora

Bakterijske spore imaju nekoliko strukturnih slojeva (Slika 2.) (Paredes-Sabja i sur., 2014). Unutrašnjost spore čini jezgra koja sadrži DNA, RNA i većinu enzima. Nizak sadržaj vode, niži pH, visoka razina DPA (dipicolinic acid) i Ca^{2+} iona te vezanje malih, u kiselini topljivih, α/β proteina (small, acid-soluble spore proteins, SASP) na DNA najviše doprinose otpornim svojstvima spore (Paredes-Sabja i sur., 2014). Manji sadržaj vode i niži pH povezani su sa smanjenom enzimskom aktivnosti. Ca-DPA kompleks veže vodu unutar srži spore te tako potpomaže proces dehidracije, a uz to se i ubacuje između baza na molekuli DNA što povećava otpornost DNA na denaturaciju toplinom (Madigan i sur., 2015). SASP proteini svojim vezanjem štite DNA od mogućih oštećenja UV zračenjem, isušivanjem i toplinom. Jezgru obavija unutarnja stanična membrana koja ima sličnu fosfolipidnu strukturu kao i membrana rastuće bakterijske stanice, ali s vrlo niskom propusnošću za male molekule, uključujući i vodu. Ta odlika čuva jezgru od ulaska molekula koje bi mogle oštetiti DNA. Zametna stanična stijenka okružuje unutarnju staničnu membranu i postaje stanična stijenka rastuće bakterijske stanice tijekom germinacije.

Oko zametne stanične stijenke nalazi se debeli sloj peptidoglikana, nazvan korteks. Peptidoglikani korteksa sadrže dvije modifikacije koje ih razlikuju od peptidoglikana stanične stijenke: otprilike svaka druga molekula muraminske kiseline zamijenjena je s muramik-δ-laktamom (muramic-δ-lactam, MAL) te otprilike jedna četvrtina molekula N-acetil muraminske kiselina povezana je s peptidnim lancima isključivo preko alanina. MAL molekule specifično prepoznaju litički enzimi korteksa, koji hidroliziraju korteks za vrijeme germinacije, ali ne i staničnu stijenku. Zametna stanična stijenka i korteks važni su za održavanje integriteta unutarnje stanične membrane. Korteks je okružen vanjskom staničnom membranom koja potječe od roditeljske stanice. Ona ima bitnu ulogu tijekom formiranja spore, ali nije poznat njezin doprinos otpornosti spore nakon njezinog nastanka. Proteinski omotač koji obavija vanjsku staničnu membranu sastoji se od više od 40 proteina, od kojih su gotovo svi specifični za sporu. Omotač zaštićuje sporu od predatorskih eukariotskih mikroorganizama te od različitih reaktivnih spojeva. Spore nekih bakterijskih vrsta posjeduju još i dodatni vanjski sloj građen od proteina i ugljikohidrata, nazvan egzosporium (Paredes-Sabja i sur., 2014). Egzosporium obavija proteinski omotač i smatra se da ima ulogu u patogenezi sporama. Egzosporium povećava adheziju spora na abiotičke podloge što onda omogućuje njihov prijenos između kontaminiranih i nekontaminiranih površina (Mallozzi i sur., 2010).



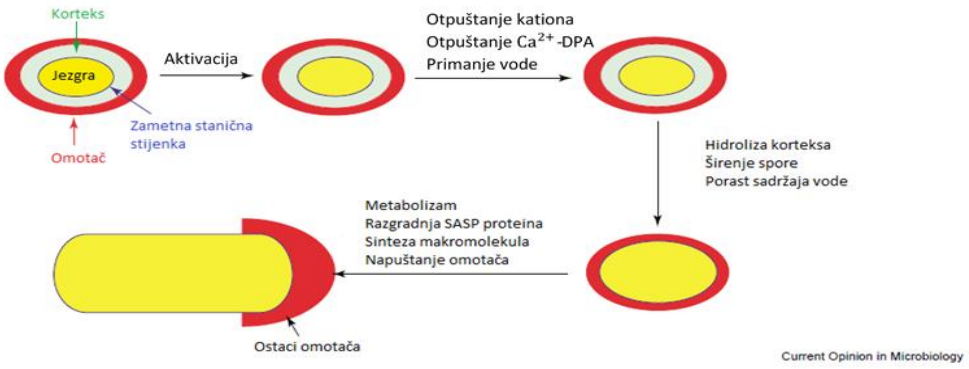
Slika 2. Strukturni slojevi bakterijskih spora

5. Germinacija bakterijskih spora

Tvari koje potiču sporu na germinaciju jednim imenom nazivaju se germinanti. Nutrijenti koji potiču germinaciju specifični su za određeni soj ili vrstu, to su najčešće L-aminokiseline, D-šećeri i purinski nukleotidi. Uz nutrijente, germinanti mogu biti i drugi agensi kao što su lizozimi, vanjski Ca^{2+} - DPA, soli ili visoki tlak.

Nutrijenti potiču germinaciju vezanjem na receptore koji su lokalizirani na unutarnjoj staničnoj membrani spore. To vezanje potiče otvaranje ionskih kanala za jednovalentne katione (H^+ i K^+ ione) i za dvovalentne Zn^{2+} ione. Uz ionske kanale dolazi i do otvaranja kanala za DPA vezanog s Ca^{2+} ionima. Gubitak iona povezan je s primanjem vode i postupnom rehidratacijom spore. Otpuštanje H^+ iona dovodi do porasta pH s ~ 6.6 do 7.7 što je bitno za metabolizam spore nakon što količina vode bude dovoljno velika za aktivnost enzima. Potom dolazi do hidrolize peptidoglikana korteksa, što je u vrste *Bacillus subtilis* kataliziranо dvama enzimima, CwlJ i SleB. Ova dva enzima specifično prepoznaju MAL (muramic-δ-lactam) prisutan samo u peptidoglikanu korteksa, što osigurava da stanična stijenka koja nema tu modifikaciju ne bude razgrađena. CwlJ se aktivira optuštanjem Ca-DPA, dok mehanizam aktivacije SleB još nije poznat.

Hidroliza korteksa omogućuje širenje spore pri čemu dolazi do dodatnog porasta sadržaja vode do razine prisutne u rastućoj bakterijskoj stanici. Završetak germinacije tada omogućuje mobilnost i aktivnost enzima i omogućen je ponovni rast stanice. Dolazi do hidrolize SASP proteina vezanih za DNA, koji predstavljaju izvor ugljika i energije za novu vegetativnu stanicu, ponovnog metabolizma, sinteze makromolekula te sve kulminira replikacijom DNA (Setlow, 2003).



Slika 3. Glavni koraci u procesu germinacije bakterijskih spora

6. Nastanak tumora i hipoksija

Tumor karakterizira nekontrolirana podjela stanica koja dovodi do nekontroliranog rasta određenog tkiva. Do toga dolazi zbog narušavanja ravnoteže između signala koji potiču i suspregu stanični rast. Uzroci koji mogu potaknuti nastanak tumora su naslijeđene genetičke predispozicije za razvoj tumora, okolišni utjecaji ili određeni kemijski spojevi koji djeluju na strukturu genoma i mogu uzrokovati mutacije koje dovode do promjene u ekspresiji gena i procesima u koje su oni uključeni.

Oko 80% tumora klasificiraju se kao solidni. Većina njih sadrži velike regije slabo oksigeniranog tkiva, što nazivamo hipoksijom. Krvne žile ne mogu opskrbiti sve stanice tumora s dovoljnom količinom kisika i hranjivih tvari (Brown i Wilson, 2004). Tumorske stanice u proliferaciji troše više kisika i dolazi do hipoksije zbog neravnoteže između dotoka kisika i njegove potrošnje. Hipoksija djeluje i na pojačano stvaranje metastaza zbog pojačane ekspresije pro-metastaznih gena i potiče ekspresiju gena povezanih s kaotičnom angiogenezom (Kubiak i Minton, 2015). Angiogeneza dovodi do nastanka novih krvnih žila koje omogućuju dotok hranjivih tvari i kisika tumorskom tkivu, te odstranjivanje otpadnih tvari i na taj način

omogućuje daljnju proliferaciju i rast tumorskog tkiva, a time i nastanak metastaza (Nishida i sur., 2006)

7. Povijest korištenja vrsta roda *Clostridium* u terapijama liječenja tumora

Korištenju vrsta roda *Clostridium* kao vektora u tumorskim terapijama prethodio je velik broj eksperimentalnih i kliničkih istraživanja. Već 1813. Vautier je zabilježio da su se pacijenti kojima je dijagnosticiran tumor neočekivano izliječili nakon što su preboljeli plinsku gangrenu, infekciju uzrokovanu *C. perfringens* (Kubiak i Minton, 2015). Zabilježena regresija tumora u ovim pacijentima povezuje se s mogućnošću da je bakterija *C. perfringens,* unutar hiopoksičnih regija tumora pronašla uvjete slične onima u crijevu čovjeka i da je imala lokalni antitumorski učinak (Barbé i sur., 2006). Godine 1935. Connell ubrizgava sterilni filtrat *C. histolycum* koji sadrži proteolitičke enzime direktno u tkivo zahvaćeno tumorom kako bi potaknuo njegovu regresiju. Kasnije, Parker i suradnici ubrizgavaju spore *C. histolycum* u tumor miša, što dovodi do vidljive lize tumorskog tkiva i predstavlja prvo korištenje cijele bakterije u regresiji tumora.

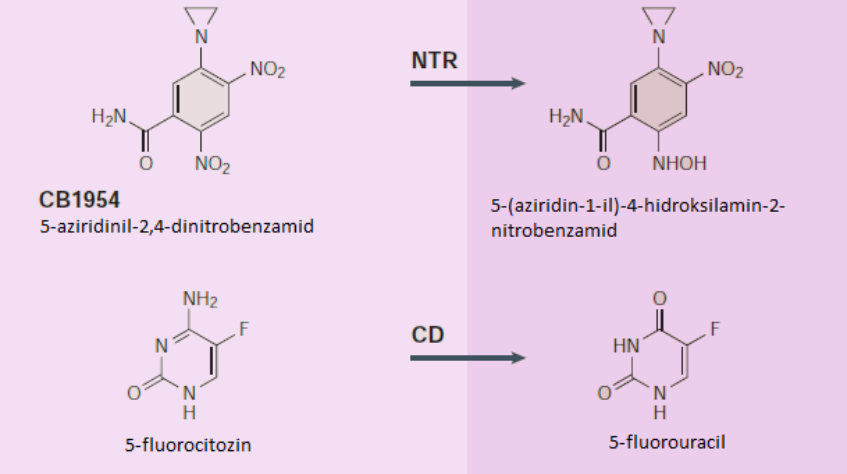
Bitan dokaz učinkovitosti korištenja spora za regresiju tumora dobiven je istraživanjem koje su proveli Malmgren i Flaningen korištenjem vrste *C. tetani,* uzročnika tetanusa. Spore vrste *C. tetani* intravenozno su unesene u dvije skupine miševa. Miševi koji su imali tumor umrli su unutar 48h od posljedica produkcije letalnih toksina vegetativnih rastućih bakterija prisutnih unutar tumora. Suprotno tome, miševi bez tumora ostali su potpuno zdravi bez obzira na injekciju spora *C. tetani* jer spore nisu mogle započeti germinaciju i stvoriti vegetativne stanice. To proučavanje upućuje da spore prolaze proces germinacije isključivo unutar tumora, što omogućuje produkciju i otpuštanje toksina što rezultira smrću miša.

Kako bi se izbjeglo korištenje patogenih vrsta bakterija, kao što su *C. histolycum* i *C. tetani,* Möse i suradnici ispitali su mogućnost korištenja nepatogene vrste *C. butyricum.* Značajan onkolitički efekt primjećen je nakon injeciranja spora u životinje, a kasnije i u ljudske pacijente. Zbog tih značajki soj je nazvan *C. oncolyticum,* a kasnije je reklasificiran u *C. sporogenes* M-55 (Kubiak i Minton, 2015)

8. *Clostridium* i DEPT (Directed enzyme prodrug therapy)

Različite vrste roda *Clostridium* potiču regresiju tumora, ali su dodatna istraživanja pokazala da se bolji učinak postiže njihovom kombinacijom s različitim protutumorskim lijekovima. Idealna tumorska terapija trebala bi ciljati samo tumorske stanice bez utjecaja na zdravo tkivo. To se može postići korištenjem bezopasnog lijeka koji poprima toksičan efekt samo unutar tumora pomoću aktivnosti enzima (prodrug converting enzyme, PCE) koji je lokaliziran specifično unutar tumora. Ova strategija nazvana je DEPT (directed enzyme prodrug therapy) (Kubiak i Minton, 2015).

Dosadašnja istraživanja DEPT-a bazirala su se na pronalazak učinkovite kombinacije protutumorskog lijeka i PCE-a koji će katalizirati njegovu pretvorbu u toksičan agens. Dva najviše istražena protutumorska lijeka su 5-FC (5-fluorocitozin) i CB1954. Bakterijski enzim citozin deaminaza katalizira pretvorbu 5-FC (5-fluorocitizin) u toksični 5-FU (5-fluorouracil). 5-FU dalje se metabolizira u dva inhibitora DNA i RNA sinteze. Bakterijski enzim nitroreduktaza reducira 4 dušične skupine CB1954 pri čemu nastaje citotoksični hidroksilamin koji uzrokuje križanje lanaca DNA molekula (Slika 4.) (Minton, 2003).

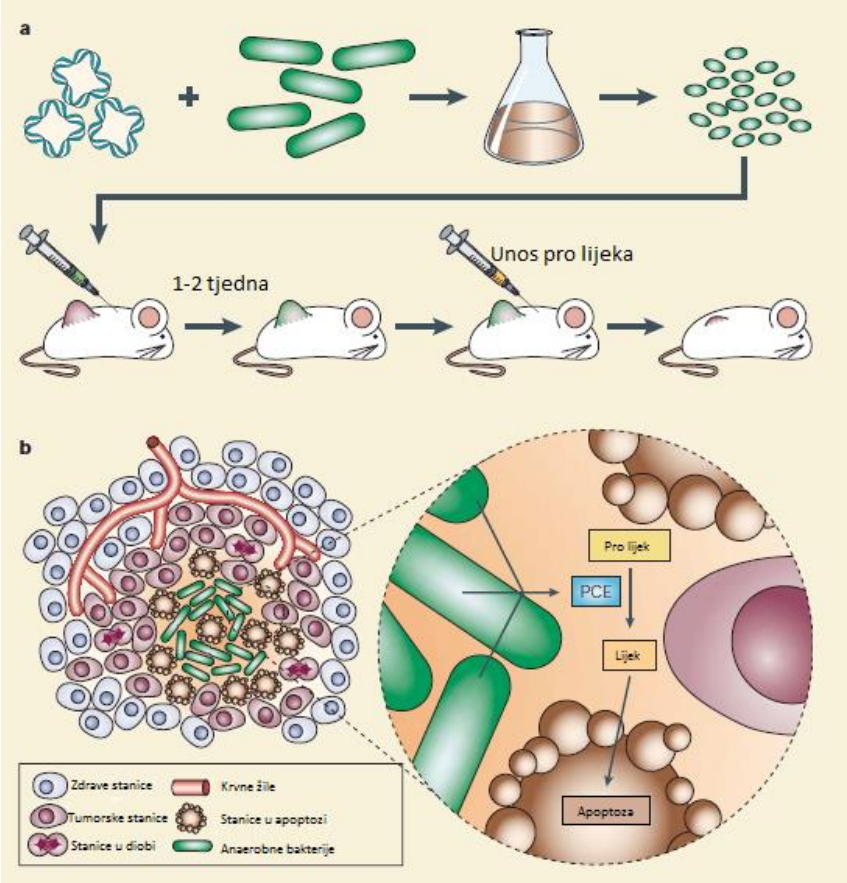


Slika 4. Pretvorba protutumorskih lijekova u toksične agense pomoću PCE enzima

Pronalazak, izolacija i ispitivanje upotrebe drugih PCE enzima nastavlja se paralelno s pronalaskom najboljih vektora za njihov unos u tumorsko tkivo. Za sada postoji mogućnost

unosa PCE enzima pomoću specifičnih tumorskih protutijela (antibody-directed prodrug therapy, ADEPT) ili pomoću gena koji kodiraju PCE enzime, a u tumor se unose korištenjem određenih vektora (gene-directed prodrug therapy, GDEPT). CDEPT (*Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy) je novija inačica DEPT-a i temelji se na korištenju spora vrsta roda *Clostridium* kao vektora za unos PCE enzima u hipoksična tumorska tkiva (Kubiak i Minton, 2015).

Gen koji kodira PCE enzim (prodrug-converting enzyme) ugrađuje se u plazmid vektora u kojem se umnaža u velikim količinama. Potom se taj plazmid koji sadrži gen za PCE transformacijom prenosi u bakteriju. Zatim se potiče nastanak spora onih bakterijskih stanica koje su primile plazmid. Suspenzija spora intravenozno se unosi u domaćina s tumorom. Spore se šire tijelom, ali samo one koje se susretnu s hipoksičnim uvjetima koji prevladavaju unutar tumora mogu proći proces germinacije i umnažati se kao vegetativne stanice. Nakon 1-2 tjedna u domaćina se unosi pro-lijek koji se sustavno širi čitavim organizmom. Pro lijek (npr. 5-FC) pretvara se u toksičan lijek (npr. 5-FU) isključivo unutar tumora djelovanjem PCE enzima (npr. citozin deaminaze) kojeg proizvode vegetativne bakterijske stanice (Slika 5.) (Minton,2003).



Slika 5. *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy (CDEPT)

Gen koji kodira HinNTR (nitroreduktazu izoliranu iz *Haemophilus influenza*), još nazvanu i NTR-H, kloniran je unutar vektora i prenesen je u *Clostridium sporogenes. In vivo* eksperimenti pokazali su dobru tumor specifičnu germinaciju i upućuju na mogućnost upotrebe spora *C. sporogenes* kao vektora za prijenos NTR-H enzima u tumore. Rekombinantne spore ove bakterije ispitivane su u uzastopnim tretmanskim ciklusima što je imalo značajan antitumorski učinak. To istraživanje upućuje na to da bi se ponovljeni tretmanski ciklusi CDEPT-a mogli koristiti u budućim kliničkim liječenjima (Kubiak i Minton, 2015).

9. Upotreba *Clostridium ssp.* u drugim antitumorskim terapijama

9.1. *Clostridium novyi-NT*

Bakterija *Clostridium novyi* pokazuje značajni antitumorski učinak zbog velike pokretljivosti unutar samog tumora, što osigurava maksimalno širenje bakterije, a time i terapeutskog produkta. Uz to vrlo je osjetljiva na prisutnost kisika što ograničava njezin rast na hipoksične regije organizma prisutne u tumoru. Međutim, tijekom prvog primjenjivanja trećina miševa umrla je unutar 16-18 h nakon unosa spora kao rezultat produkcije letalnih toksina. Letalan toksin (α) lokaliziran je unutar faga i uklonjen je zagrijavanjem. Kao rezultat toga, dobiven je derivat nazvan *Clostridium novyi-NT* za koji je dokazano da je siguran za uporabu u daljnjim istraživanjima antitumorskih terapija (Wei i sur., 2008).

Korištenje spora *C. novyi-NT* u kombinaciji s radioterapijom pokazalo je značajan antitumorski učinak. Kako su slabo oksigenirane tumorske stanice otpornije na radijacijske terapije, smatralo se da bi korištenje anaerobnih spora moglo povećati osjetljivost hipoksičnog tkiva na radijaciju, što se potvrdilo točnim (Kubiak i Minton, 2015). Radioterapija se temelji na primjeni antitijela obilježenih radioaktivnim izotopom. Zadataka tako obilježenih antitijela je isporučiti štetnu radijaciju do ciljanih, odnosno tumorskih stanica. Antitijelo reagira s antigenima koji se povećano eksprimiraju na tumorskim stanicama (Larson i sur., 2015).

Primjena spora zajedno s radioterapijom omogućilo je smanjenje doze radioaktivno obilježenih antitijela, što rezultira smanjenjem štetnog djelovanja na zdrava tkiva.

Provedena su *in vitro* istraživanja u kojima se *C. novyi-NT* koristi u kombinacija sa specifičnim antitijelima (*Clostridium*-directed antibody therapy, CDAT). Istraživanja su se bazirala na hipoksija-inducibilni faktor-1-alfa (hypoxia-inducible factor-1-alpha, HIF-1α), čija je aktivnost u vezi s povećanom tumorskom otpornošću na radioterapije i kemoterapije. U istraživanju su korištene rekombinante stanice *C. novyi-NT*, koje su primile plazmid s genom za VHH antitijelo (specifično za HIF-1α antigen). *In vitro* eksperiment potvrdio je da su antitijela izolirana iz bakterijskih stanica zadržala svoju aktivnost i specifičnost prema antigenu. Ovo istraživanje upućuje na mogućnost kombiniranja terapije antitijelima s bakterijskim terapijama (Kubiak i Minton, 2015).

9.2. *Clostridium perfringens*

Iako se inače asocira s trovanjem hranom i plinskom gangrenom, *Clostridium perfringens* je također sposobna selektivno kolonizirati hipoksične regije tumorskog tkiva. Hipoksične regije tumora gušterače uključene su u istraživanje djelovanja ove bakterijske vrste. Soj ove vrste genetički je modificiran kako bi se eliminirao gen za toleranciju kisika, superoksid dismutaza. Dalje je rekombiniran kako bi mogao ekspresirati gen za Panton-Valentine Leukocidin citotoksin (PVL), koji suzbija upalne procese. Istraživanje provedeno na miševima kojima je ubrizgana *C. prefringens* koja ekspresira PVL citotoksin rezultiralo je smanjenjem upala, povećanjem nekroze tumora i produljenjem preživljavanja (i do 120 dana u 47% pokusnih životinja). Međutim, istraživanje je dizajnirano samo za jedan tip tumora, te se u pola pokusnih životinja, tumor vratio, uzrokujući smrt. No, primarni rezultati su obećavajući te otvaraju mogućnost kombinacije ovog tretmana sa standardiziranim tretmanima, poput kemoterapije.

U nekoliko tipova tumora, poput tumora dojke, jajnika ili gušterače, ekspresija specifičnih transmembranskih proteina, nazvanih klaudinima (kao što su Cldn3 i Cldn4) bila je povišena. Enterotoksini *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin, CPE) vežu se za ove

receptorske proteine, što dovodi do stvaranja pora unutar membrana epitelnih stanica. Priljev Ca^{2+} u stanicu kroz novonastale pore dovodi do njezine smrti.

No, kako su Clnd3 i Clnd4 receptori prisutni i u zdravom tkivu trebaju se provesti istraživanja i na netumorskim uzorcima. Uz to, enterotoksini su značajan virulentni faktor, povezan s bakterijskim trovanjem hranom koje uzrokuje soj A *C. perfringens*. Iako se većina oboljelih oporave od trovanja hranom unutar 24 h, za neke pacijente bolest može biti letalna. Zbog ovih razloga, sve dok postoje nepatogene opcije, tretmani s *C. perfringens* će se malo vjerojatno koristiti (Kubiak i Minton, 2015).

9.3. *Clostridium acetobutylicum*

U istraživanju koje je proveo Theys 1999. nepatogeni soj *Clostridium acetobutylicum,* nazvan DSM792, korišten je kako bi izlučio nekrotski faktor mišjeg tumora (murine tumour necrosis factor, mTNF-α). To je citokinin koji stimulira akumulaciju makrofaga, neutrofila i T stanica, čime potiče izravan antitumorski odgovor. Drugi citokinin, iz štakora izoliran interleukin-2 (IL-2) pokazao je značajniji učinak na regresiju tumora.

Kada su rekombinantne spore terapeutskog soja *C. acetobutylicum* koje proizvode IL-2 citokinin primjenjene na štakorima zajedno u kombinaciji s radioterapijom, primijećena je značajna regresija tumorskog tkiva. Uzrok tome je povećana aktivnost imunološkog sustava. IL-2 unesen samostalno, kao pročišćena proteinska suspenzija, nije imao jednak učinak, što ukazuje na važnost bakterijskog vektora. No, vjerojatnije je da će se za terapije s citokininima u budućnosti koristiti učinkovitiji kolonizatori, kao što je *C. sporogenes* (Kubiak i Minton, 2015).

Način na koji korištenje vrsta roda *Clostridium* u liječenju tumora može biti poboljšano, a i prošireno na manje tumore koji još nisu razvili hipoksične regije, je korištenjem faktora koji razgrađuju krvne žile (vascular targeting agents). Korištenjem ovih faktora postiže se povećanje hipoksične regije tumora, te se time povećava površina kolonizacije te veći broj bakterijskih stanica dospijeva unutar tumora, a time se postiže i veća koncentracija terapeutskih enzima.

Zbog toga *C. acetobutylicum* možda i postane prihvatljiviji izbor za terapiju s citokininima (Brown i Wilson, 2004).

10. Zaključak

Prošlo je više od 80 godina otkako su se spore vrsta roda *Clostridium* počele primjenjivati u tumorskim terapijama, ali tek u zadnjem desetljeću postignut je značajan napredak prema mogućem korištenju ovih bakterija u liječenju ljudi (Kubiak i Minton 2015).

Još uvijek nije jasno koji soj predstavlja najbolji vektor za unos protutumorskih lijekova u hipoksične regije tumora. Proteolitički sojevi poput *C. sporogenes* i *C. novyi* bolji su u kolonizaciji tumora, no njihova agresivna svojstva mogu dovesti do toksičnosti. Saharolitički sojevi, poput *Clostridium acetobutylicum* slabiji su kolonizatori, no u kombinaciji s faktorima koji razgrađuju krvne žile mogu se ispostaviti kao bolji izbor (Minton, 2003).

Prema dobivenim rezultatima pretpostavlja se da će CDEPT uskoro započeti klinička ispitivanja, dok ohrabrujući rezultati dobiveni korištenjem spora *C. novyi-NT* upućuju na značajnu ulogu bakterija u budućem liječenju tumora (Kubiak i Minton, 2015).

11. Literatura

Barbé S, Van Melleaert L, Anné J. 2006. The use of clostridial spores for cancer tretment. *Journal of applied microbiology* 101.3 (2006): 571-578.

Brown JM, Wilson WR. 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437-447.

Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1.2 (2003): 117-126.

Kubiak AM, Minton NP. 2015. The potential of clostridial spores as therapeutic delivery vehicles in tumour therapy. *Research in microbiology* 166.4 (2015): 244-254.

Larson SM, Carrasquillo JA., Cheung NKV, Press OW. 2015. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 347-360.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2015. *Brock Biology of Microorganisms.* 14th edition. Prentice Hall, New Jersey, USA. International Edition.

Mallozzi M, Viswanathan, VK, Vedantam G. 2010. Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease. Future microbiology, 5(7), 1109-1123.

Minton NP. 2003. Clostridia in cancer therapy. *Nature Reviews Microbiology* 1.3 (2003): 237-242.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. 2006. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213.

Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. 2014. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in microbiology* 22.7 (2014): 406-416.

Setlow P. 2003. Spore germination. *Current opinion in microbiology* 6.6 (2003): 550-556.

Setlow P. 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in microbiology* 15.4 (2007): 172-180.

Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anné J. 2008. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer letters* 259.1 (2008): 16-27.

Web izvor

1. https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospore