KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 66 2017
Numer 1 (314)
Strony 93–107

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

ELŻBIETA KATARZYNA JAGUSZTYN-KRYNICKA, MAGDALENA GRZESZCZUK, PATRYCJA KOBIERECKA

Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
E-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

NOWE STRATEGIE WALKI Z CHOROBAMI ZAKAŹNYMI – LEKI SKIEROWANE PRZECIWKO CZYNNIKOM WIRULENCJI

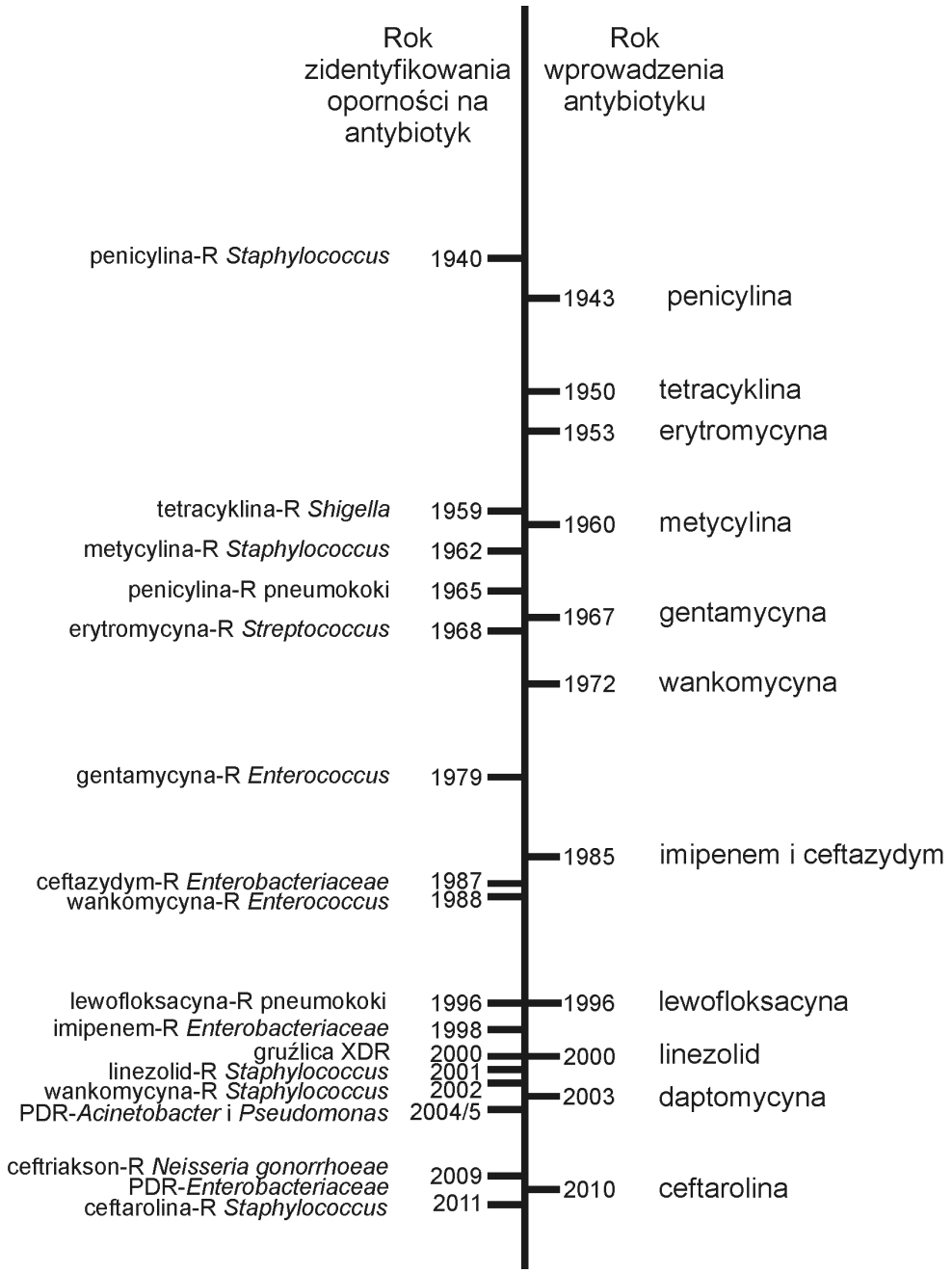
WSTĘP – ZMIERZCH ERY ANTYBIOTYKÓW

Odkrycie antybiotyków i wprowadzenie ich to powszechnego użycia można uznać za jedno z najistotniejszych osiągnięć medycyny XX w. Terapie antybiotykowe w znaczący sposób obniżyły zachorowalność i śmiertelność z powodu chorób infekcyjnych, wywierając korzystny efekt nie tylko w odniesieniu do poszczególnych osobników, ale także poprzez ograniczenie rozprzestrzeniania się patogennych mikroorganizmów.

Pierwszy antybiotyk, penicylina, odkryty w 1928 r. przez Aleksandra Fleminga, został wprowadzony do powszechnego użytku w latach 40. XX w. Do początku lat 60. poprzedniego wieku wprowadzono na rynek 20 nowych klas antybiotyków. Od tego czasu szybkość odkrywania nowych klas tych leków w znaczący sposób zmalała. Wprowadzane na rynek nowe antybiotyki są przede wszystkim analogami już istniejących i tak np.: tigecyklina to trzeciej generacji tetracyklina, ceftarolina należy do piątej generacji cefalosporyn, a adoripenem to nowy syntetyczny lek z grupy karbapenemów (COATES i współaut. 2011, VENTOLA 2015b). Dwie nowe klasy antybiotyków, które pojawiły się w ostatnich 30 latach, reprezentuje linezolid, należący do klasy oksaolidynonów, i daptomycyna, przedstawiciel klasy cyklicznych lipopeptydów. Oba leki są aktywne przeciwko Gram-dodatnim patogenom, takim jak np. oporne na penicylinę pneumokoki czy oporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus* (NORRBY i współaut. 2005). Jednocześnie, w tym samym czasie obserwujemy niesłychanie szybko powiększającą się liczbę szczepów bakterii patogennych, zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, opornych na antybiotyki. Zwiększa się nie tylko liczba wielolekoopornych szczepów, tzw. MDR (ang. multidrug-resistant), ale także szczepów o wyjątkowej oporności, XDR (ang. extensively drug-resistant), a ostatnio wprowadzono termin PDR (ang. pandrug-resistant) dla opisywania szczepów bakteryjnych opornych na wszystkie dostępne antybiotyki. Dokładne definicje wymienionych terminów oraz metod używanych do określania przynależności szczepów do konkretnej kategorii zostały ustalone przez międzynarodowe gremia specjalistów (MAGIORAKOS i współaut. 2012). Szczepy oporne na konkretne, „nowe" antybiotyki pojawiają się stosunkowo szybko po wprowadzeniu leków do terapii. I tak np., szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę zidentyfikowano już w 1962 r. w Wielkiej Brytanii i w 1968 r. w USA (lek wprowadzono w 1960 r.), a oporne na linezolid już w 2001 r., w niecały rok po wprowadzeniu leku na rynek. Ryc. 1 przedstawia historię wprowadzania do lecznictwa antybiotyków i pojawiania się opornych szczepów bakteryjnych (CDCP 2013). Mikroorganizmy,

Praca została częściowo sfinansowana w ramach realizowanego projektu grantowego NCN „Opus 9" 2015/17/B/NZ1/00230.

Słowa kluczowe: antybiotyki, bakterie, choroby zakaźne, leki blokujące procesy wirulencji



Ryc. 1. Kalendarium wprowadzania nowych antybiotyków i pojawiania się opornych na nie szczepów bakteryjnych.

stanowiące istotne zagrożenie dla ludzkości ze względu na proces wielolekooporności (*Enterococcus faecalis, Staphylococus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobater iaceae*), zostały zaliczone do tzw. grupy ESKAPE, dla podkreślenia ich zdolności do „ucieczki" wszelkim działaniom terapeutycznym i naszej bezsilności (RICE 2008, BOUCHER i współaut. 2009). Brak terapeutycznych opcji zmusza często klinicystów do powrotu do stosowania „starych" antybiotyków, wycofanych z użycia ze względu na ich wysoką toksyczność, takich jak np. kolistyna (polimyksyna E) (FALAGAS i KASIAKOU 2005). Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki są bardzo różne. Do najważniejszych można zaliczyć: inaktywację lub modyfikację celu działania antybiotyku, modyfikacje antybiotyku, obniżenie poziomu wnikania do komórki lub aktywny proces usuwania antybiotyku. Geny warunkujące oporność generowane są głównie na drodze mutacji lub rearanżacji materiału genetycznego, a ich rozprzestrzenianie warunkują różnorodne procesy wymiany materiału genetycznego

między mikroorganizmami, tzw. horyzontalny transfer genów. Pojawianie się oporności na leki jest naturalnym zjawiskiem, ale szybkie rozprzestrzenianie się i selekcja szczepów opornych jest wynikiem niewłaściwego i zbyt masowego stosowania tych leków w terapiach ludzi, w weterynarii i rolnictwie (NORMARK i NORMARK 2002; VENTOLA 2015a, b; HOLMES i współaut. 2016).

Coraz większa liczba klinicznych izolatów bakteryjnych opornych na stosowane leki wymusza szybkie poszukiwanie nowych metod profilaktycznych i terapeutycznych. Wiele światowych agencji czy towarzystw naukowych zwraca uwagę na zaistniałą sytuację kryzysową i promuje tego typu badania. IDSA (ang. Infectious Diseases Society of America) w 2004 r. opublikowała raport "Bad Bugs, No Drugs" opisujący aktualną sytuację, w której grozi ludzkości powrót do czasów „przedantybiotykowych". Jednocześnie ta sama agencja ogłosiła program nawołujący do podjęcia wysiłków w celu opracowania co najmniej 20 nowych leków antybakteryjnych do 2020 r. (IDSA 2010). Europejska publiczno-prywatna inicjatywa (ang. The Innovative Medicine Initiative, IMI), będąca największą światową organizacją partnerstwa prywatno-publicznego (PPP) założoną w 2008 r. przez EFPIA (ang. European Federation of Pharmaceutical Industries) i Unię Europejską (ang. European Commission's Seventh Framework Programme for Research, FP7), w 2012 r. stworzyła platformę dla badań dotyczących nowych terapii o akronimie ND4BB (ang. New Drugs for Bad Bugs) (KOSTYANEV i współaut. 2016). Inna światowa inicjatywa skupiająca instytucje z 22 krajów, JPIAMR (ang. Joint Programming Initiative on Anitmicrobial Resistance; www.jpiamr.eu/), finansuje badania mające na celu wprowadzenie na rynek nowych leków antybakteryjnych oraz zakrojoną na szeroką skalę działalność edukacyjną.

Od początków XXI w. obserwujemy wyraźny przełom w badaniach mikrobiologicznych, przejście od analiz funkcjonalnych i klonowania pojedynczych genów do globalnych analiz procesów zachodzących w komórkach, analiz genomów, transkryptomów, proteomów czy interaktomów. Rozwój metagenomiki (izolacja i analiza DNA bezpośrednio ze środowiska) uzmysłowiła, jak znikoma jest nasza wiedza dotycząca mikroorganizmów obecnych w otaczającym nas świecie. Strategie metagenomowe mogą przyczynić się do odkrycia nowych leków antybakteryjnych produkowanych przez mikroorganizmy, których nie potrafimy hodować w laboratorium. Przykładem mogą być badania opublikowane w 2015 r., które doprowadziły do zidentyfikowania nowego antybiotyku, tejksobaktyny, produkowanego przez „niehodowalną" bakterię glebową *Eleftheria terrae*, blokującego proces syntezy ściany komórkowej takich patogenów jak *S. aureus* czy *Mycobacterium tuberculosis* (LING i współaut. 2015).

NOWA GENERACJA LEKÓW ANTYBAKTERYJNYH – LEKI BLOKUJĄCE PROCESY WIRULENCJI

Antybiotyki działają bakteriobójczo lub bakteriostatycznie, blokując podstawowe procesy życiowe komórek bakteryjnych, takie jak np. proces syntezy osłon komórkowych czy proces translacji. Prezentowana praca przeglądowa przedstawia osiągnięcia ostatnich lat dotyczące opracowywania leków antybakteryjnych o odmiennym sposobie działania, tzw. leków antywirulentnych, blokujących w różnorodny sposób procesy wirulencji. Potencjalne leki antywiruletne powinny zwiększyć arsenał związków antybakteryjnych czy wspomagać działanie stosowanych już antybiotyków. Dodatkowo, ich wprowadzenie nie powinno mieć wpływu na selekcję szczepów opornych oraz, co jest w świetle najnowszych badań niesłychanie istotne, raczej nie powinno, w przeciwieństwie do klasycznych antybiotyków, zakłócać składu fizjologicznej flory bakteryjnej kolonizującej układ pokarmowy człowieka (BECATTINI i współaut. 2016). Przyjętym w tym opracowaniu kryterium klasyfikacji potencjalnych leków są cele ich działania. Przedstawiono badania mające na celu opracowanie leków blokujących procesy adhezji, procesy sekrecji czynników wirulencji czy aktywność toksyn bakteryjnych. Oddzielnie omówiono dane eksperymentalne prezentujące potencjalne leki, inhibitory globalnych procesów zachodzących w komórkach bakteryjnych, prowadzących do wytwarzania wielu czynników wirulencji (zjawisko wyczuwania zagęszczenia; ang. quorum sensing, QS), regulację ekspresji genów przez układy dwuskładnikowe TCS (ang. two component system) czy procesy potranslacyjnych modyfikacji białek (aktywność białek systemów Dsb; ang. disulfide bond). Inhibitory z pierwszej wymienionej grupy będą lekami o wąskim zakresie działania, podczas gdy te z grupy drugiej będą prawdopodobnie aktywne przeciwko bakteriom patogennym różnych gatunków. Badania tego typu prowadzone są w licznych laboratoriach, tak więc przedstawiona praca przeglądowa to tylko wybrane przykłady omawianych aktywności, a nie wyczerpująca ich prezentacja.

Identyfikacja małych cząsteczek, inhibitorów procesów wirulencji, to badania stosunkowo długotrwałe i kosztowne. Oblicza się, że czas od rozpoczęcia analiz do wprowadze-

nia leku na rynek będzie wynosił ponad 10 lat. Pierwszym etapem badań jest wysokoprzepustowa analiza działania bibliotek małych cząsteczek lub peptydów *in vitro* (ang. high through put screening, HTS). Analizy obejmują często kilkadziesiąt tysięcy związków i wymagają opracowania odpowiednich testów do wykrywania aktywności potencjalnych inhibitorów. Stosowane strategie są różne w zależności od badanego procesu. Często wykorzystywane są geny reporterowe, kodujące białka o łatwej do monitorowania aktywności, lub testy ELISA. Komplementarna strategia to analizy *in silico* wykorzystujące rozwiązane struktury białek i analizujące, jak wiązanie potencjalnych inhibitorów zaburza ich strukturę i funkcję – strategia SBVS (ang. structure based virtual screening), określana też jako SBDD (ang. structure based drug design) lub RTDD (ang. rational target-based drug design). Dalsze analizy, znane pod nazwą SAR (ang. structure-activity relationship), pozwalają analizować powiązanie struktury inhibitora z jego aktywnością. Wraz z identyfikacją celu działania mogą doprowadzić do wskazania potencjalnie najskuteczniejszego związku. Przed rozpoczęciem testów klinicznych potencjalny lek musi być przebadany na modelach zwierzęcych oraz pod kątem jego właściwości farmakokinetycznych i dynamiki działania.

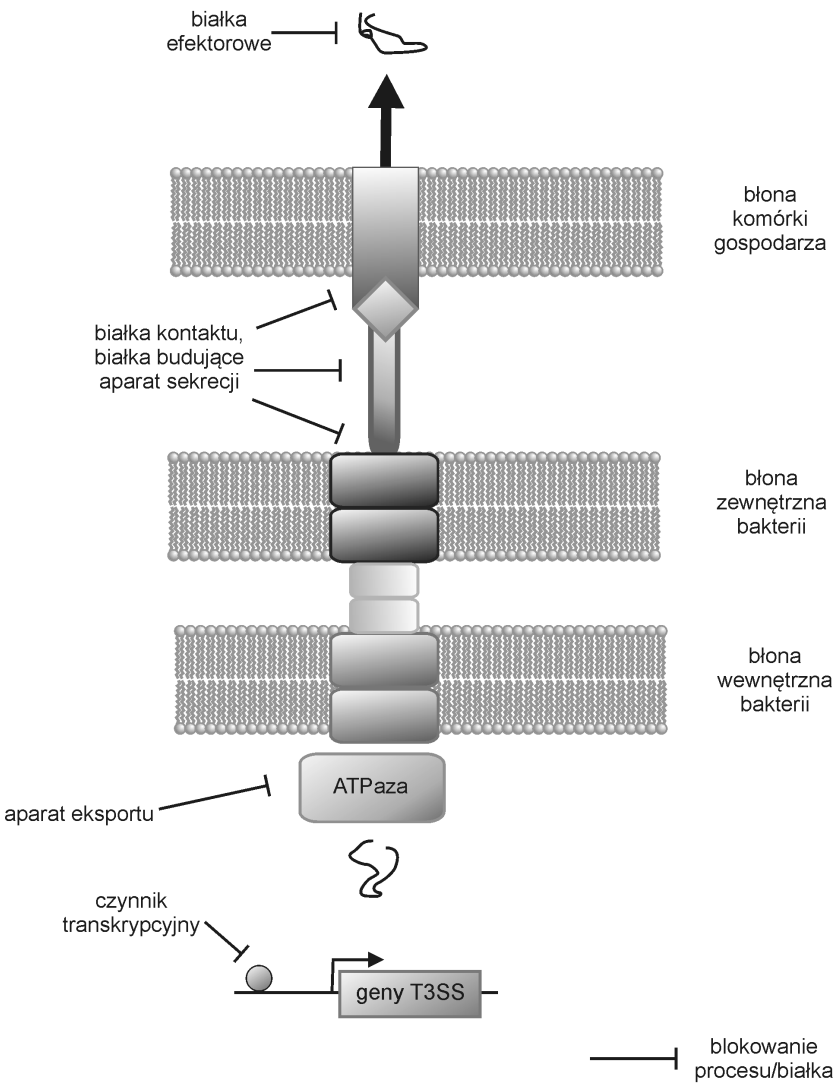
UNIECZYNNIENIE SEKRECJI BIAŁEK PATOGENU DO KOMÓRKI EUKARIOTYCZNEJ

W komórkach mikroorganizmów funkcjonuje wiele rodzajów systemów sekrecji. Różnice polegają zarówno na budowie aparatów sekrecyjnych, jak i transportowanych substratach. W związku z odmienną architekturą osłon komórkowych bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie wykształciły odmienne systemy transportu białek na zewnątrz komórek (CHAGNOT i współaut. 2013). Największe zainteresowanie, z punktu widzenia poszukiwania inhibitorów procesów sekrecji, przykuwają funkcjonujące w komórkach bakterii Gram-ujemnych systemy sekrecji typu III (T3SS) i IV (T4SS). System sekrecji typu III stanowi istotną broń patogenu. Jest to układ jednoetapowego transportu, co oznacza, że jego substraty, tzw. białka efektorowe, przekazywane są bezpośrednio z cytozolu komórki patogenu do komórki eukariotycznej, gdzie w różnorodny sposób wpływają na procesy metaboliczne gospodarza, modulując je w korzystnym dla siebie kierunku. Aparat sekrecji, który powstał w wyniku duplikacji i późniejszych zmian genów kodujących rzęski bakteryjne, zbudowany jest z ponad dwudziestu białek. Po kontakcie patogenu z komórką eukariotyczną powstaje struktura zwana molekularną strzykawką, zdolna do przekazania do komórki gospodarza nawet kilkudziesięciu białek o różnorodnej aktywności (NORMARK i współaut. 2005, GALAN i współaut. 2014, PORTALIOU i współaut. 2016).

Do tej pory zidentyfikowano wiele związków blokujących działanie T3SS (MCSHAN i DE GUZMAN 2015). Potencjalne możliwości blokowania funkcjonowania T3SS przedstawiono na Ryc. 2. Najdokładniej przebadano działanie związków z grupy SAH (acylohydrazydy salicylidenowe). Po raz pierwszy ich hamującą aktywność wykazano w odniesieniu do T3SS *Yersinia pseudotuberculosis*. Przebadano 9.400 różnych związków, stosując do przeszukiwania biblioteki szczep *Y. psedotuberculosis* zawierający gen reporterowy *luxAB*, kodujący lucyferazę (enzym wywołujący bioluminescencję), sklonowany pod kontrolą promotora genu *yopE* (gen kodujący jedno z białek efektorowych *Yersinia*) (KAUPPI i współaut. 2003, NORDFELTH i współaut. 2005). Związki o podobnych strukturach blokują także aktywność T3SS innych gatunków patogennych mikroorganizmów Gram-ujemnych, między innymi *Escherichia coli* czy *Salmonella enterica* serowar Typhimurium (GAUTHIER i współaut. 2005, NEGREA i współaut. 2007). Dokładny mechanizm działania związków z grupy SAH nie został dotąd poznany. Publikowane dane są kontrowersyjne i być może związki te blokują aktywność T3SS zarówno w sposób pośredni, jak i bezpośredni, a mechanizm ich działania nie musi być identyczny w komórkach różnych gatunków mikroorganizmów (KEYSER i współaut. 2008, MCSHAN i DE GUZMAN 2015).

Ciekawą strategią blokowania T3SS, przebadaną szczegółowo w odniesieniu do terapii anty-*Pseudomonas aeruginosa*, jest zastosowanie immunoterapii – odpowiednio zmienionych (humanizowanych) przeciwciał anty-PcrV. PcrV to białko występujące na zewnętrznym końcu aparatu sekrecyjnego T3SS, które rozpoznaje receptory w błonie komórki eukariotycznej. Jego zablokowanie uniemożliwia kontakt pomiędzy dwiema komórkami i tym samym blokuje przekazanie białek efektorowych. Preparat ten aktualnie znajduje się w II fazie badań klinicznych (KINOSHITA i współaut. 2016). Z dużym prawdopodobieństwem ta strategia będzie mogła być zastosowana także w terapiach chorób infekcyjnych ludzi i zwierząt, wywoływanych przez inne mikroorganizmy patogenne.

Obiektem badań mających na celu opracowanie nowych terapii przeciwko chorobom infekcyjnym wywoływanym przez bakterie Gram-dodatnie, głównie *S. aureus*, jest enzym sortaza (Str) o aktywności transpeptydazy. Decyduje on o zakotwiczeniu w osłonach



Ryc. 2. Aparat sekrecyjny typu III (T3SS). Jego aktywność potencjalnie może być blokowana na każdym etapie jego funkcjonowania (A). Schemat struktury związków typu SAH – acylohydrazydy salicylidenowe (B).

komórki wielu białek, w tym licznych czynników wirulencji. Sygnał sortujący (sekwencja aminokwasowa decydująca o lokalizacji proteiny) tej grupy białek zlokalizowany jest w ich C-końcowym odcinku. Składa się on z motywu LPXTG, za którym występuje hydrofobowy odcinek o długości około 20 aminokwasów i długa domena złożona z aminokwasów o ładunku dodatnim. Sygnał ten zatrzymuje białko w osłonach komórkowych, gdzie następuje, katalizowane przez sortazę, cięcie wiązania peptydowego pomiędzy treoniną i glicyną motywu LPXTG, a następnie przyłączenie białka w sposób kowalencyjny do grup aminowych peptydoglikanu ściany komórkowej. Przeprowadzone już stosunkowo dawno analizy wirulencji mutantów *S.aureus* nie wytwarzających sortazy wskazały na ich obniżoną wirulencję. Sklonowanie genu, otrzymanie enzymu, a następnie poznanie jego struktury umożliwiło przeprowadzenie wielu badań mających na celu identyfikację jego inhibitorów. Przebadano wiele naturalnych produktów roślinnych, np. ekstrakty z 80 roślin stosowanych w medycynie koreańskiej, syntetyczne związki zaprojektowane w oparciu o znaną strukturę enzymu oraz ostatnio wiele małych cząsteczek (strategia HTS), wykorzystując komercyjnie dostępne biblioteki. Wykazano, że wiele z nich obniża znacząco właściwości adhezyjne patogenu, zdolność do wiązania z fibronektyną, będącą składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej (Maresso i Schneewind 2008).

INHIBITORY PROCESÓW ADHEZJI

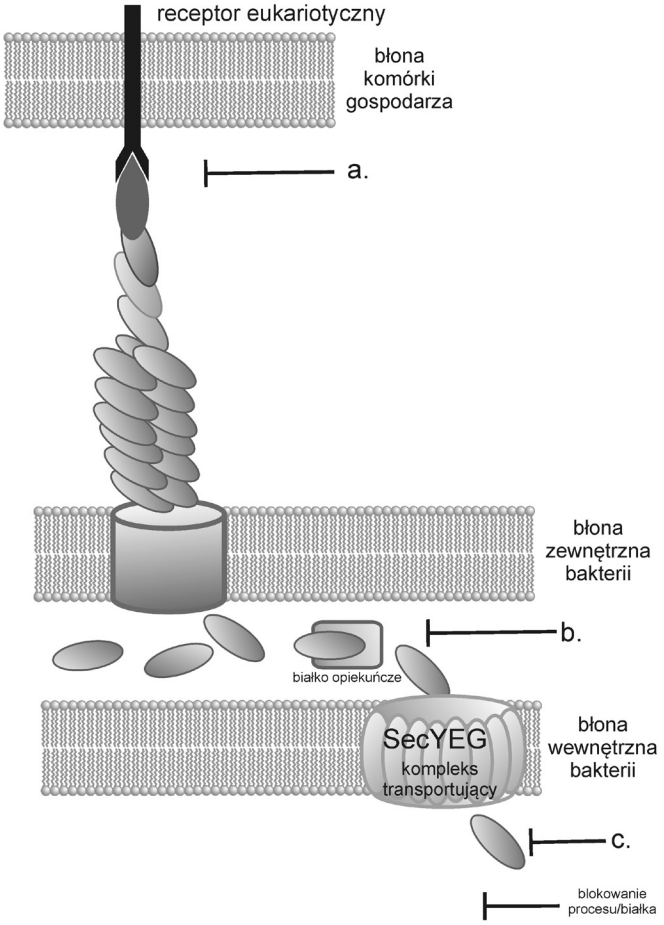
Zdecydowana większość bakterii wykazuje zdolność przylegania zarówno do materii nieożywionej, jak i do powierzchni komórek innych organizmów. Adhezja odgrywa istotną rolę w procesach patogenezy; umożliwia mikroorganizmom chorobotwórczym koloni-

zację specyficznych nisz ekologicznych. Dodatkowo, proces adhezji często stymuluje indukcję określonych szlaków transdukcji sygnału na terenie komórki gospodarza, co w niektórych przypadkach warunkuje proces wnikania patogenu do komórki eukariotycznej. Adhezja jest też pierwszym etapem tworzenia biofilmów. W najprostszym rozumieniu, proces adhezji jest reakcją pomiędzy ligandem bakteryjnym (adhezyną) a komplementarnym receptorem, zlokalizowanym na powierzchni komórki eukariotycznej. Adhezyny mikroorganizmów to białka umiejscowione na zewnątrz komórki, zakotwiczone w osłonach lub wchodzące w skład powierzchniowych organelli, takich jak np. fimbrie. Receptorami na powierzchni komórek ssaków są przede wszystkim glikoproteiny lub glikolipidy. Zablokowanie procesu adhezji jest więc potencjalną strategią spowolnienia infekcji, zapobiegania tworzenia biofilmów i umożliwienia skutecznego działania czynnikom układu odpornościowego. Testowane inhibitory blokujące proces przyłączania patogenu do receptora to głównie węglowodany lub krótkie peptydy, w zależności od budowy determinanty receptora, stanowiące jego analogi. Pierwsze testowane są jako leki, np. przeciwko uropatogennym szczepom *E. coli* (UPEC), drugie zaś jako potencjalne leki przeciwko *Streptococcus mutans* (czynnik etiologiczny próchnicy). Proces adhezji można też ograniczyć przez użycie specyficznych przeciwciał rozpoznających epitopy adhezyn. Wiadomo o korzystnym terapeutycznym działaniu soku żurawinowego w wypadku infekcji szczepami UPEC. Wykazano, że zawiera on związki o działaniu antyadhezyjnym (KLEMM i współaut. 2010, KRACHLER i ORTH 2013). Najwięcej uwagi poświęcono identyfikacji inhibitorów blokujących procesy adhezji uropatogennych szczepów *E. coli* do nabłonka dróg moczowych, warunkowane przez kilka typów fimbrii adhezyjnych (Fim, Pap, Dr). Ryc. 3 przedstawia możliwości blokowania procesu biogenezy fimbrii adhezyjnych *E. coli*. Charakteryzują się one złożoną architekturą i nietypowym procesem biogenezy zwanym „chaperon-usher" (CU). Różnorodne badania genetyczne, biochemiczne i krystalograficzne umożliwiły poznanie etapów biogenezy fimbrii. W pierwszym etapie tego procesu poszczególne białka są transportowane do peryplazmy, gdzie podjednostki białek strukturalnych łączą się z białkiem opiekuńczym. Oddziaływanie to chroni poszczególne podjednostki przed degradacją oraz, poprzez blokowanie ich aktywnych powierzchni, zapobiega przedwczesnym reakcjom pomiędzy nimi. Powstanie fimbrii adhezyjnych, poza białkiem opiekuńczym, wymaga obecności białka tzw. odźwiernego (ang. usher), budującego, podobnie do sekretyn, pory w błonie zewnętrznej. Procesy biogenezy różnych typów fimbrii są podobne, choć nie identyczne (ZALEWSKA-PIATEK 2011, LILLINGTON i współaut. 2014). Analizy SBDD doprowadziły do identyfikacji tzw. pilicydów, związków o wysokim powinowactwie do białek opiekuńczych systemu CU. Pilicydy to podstawione bicykliczne 2-pirydony. Prowadzone analizy SAR doprowadziły do zsyntetyzowania wielu związków tego typu. Ich celem działania są białka opiekuńcze różnych typów fimbrii. Pilicydy blokują rowek wiążący substrat lub wiążą się z zewnętrzną powierzchnią białka opiekuńczego oddziałującej z białkiem „odźwiernym", a tym samym blokują proces składania fimbrii (PINKNER i współaut. 2006, ABERG i współaut. 2007).

LEKI ANTYTOKSYNOWE

W wypadku niektórych patogenów istotnym, a często jedynym czynnikiem wirulencji są toksyny. Przykładami mogą być *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *C. difficile* czy *Vibrio cholerae*. Dwa pierwsze gatunki klasyfikowane są jako przedstawiciele broni biologicznej, jednej z kategorii broni masowego rażenia.

Toksyna wąglika, wytwarzana przez *B. anthracis*, wywołuje głównie choroby zwierząt hodowlanych. U ludzi diagnozowane są trzy odmiany wąglika: forma skórna, forma płucna i znacznie rzadziej występująca forma pokarmowa. We wszystkich przypadkach formą zakażającą ludzi są endospory wąglika. Forma skórna przy szybkim rozpoznaniu (nim bakterie dostaną się do krwiobiegu) jest w większości przypadków uleczalna przez zastosowanie kuracji antybiotykowej. Odmiennie przebiega postać płucna. Endospory wąglika po przeniknięciu do płuc i internalizacji przez makrofagi płucne przekształcają się w formy wegetatywne, wytwarzające groźną toksynę. Komórki żerne roznoszą i uwalniają do krwiobiegu zarówno toksynę, jak i dużą liczbę patogennych mikroorganizmów. Zastosowanie na tym etapie kuracji antybiotykowej jest już nieskuteczne. Znane są też szczepy *B. anthracis* oporne na będące w użyciu antybiotyki. Przyszłościowe, skuteczne w wypadku zakażenia inhalacyjnego, terapie będą połączeniem antybiotyków z lekami antytoksynowymi. Syntezę toksyny wąglika warunkują geny zlokalizowane na plazmidzie pXO1. Należy ona do grupy toksyn AB i złożona jest z trzech podjednostek: (i) czynnika PA, antygenu protekcyjnego (ang. potective antigen), (ii) czynnika obrzęku EF (ang. edema factor) oraz (iii) czynnika letalnego LF (ang. lethal factor). Białka transportowane są niezależnie przez osłony mikroorganizmu i składane do postaci dojrzałej tok-

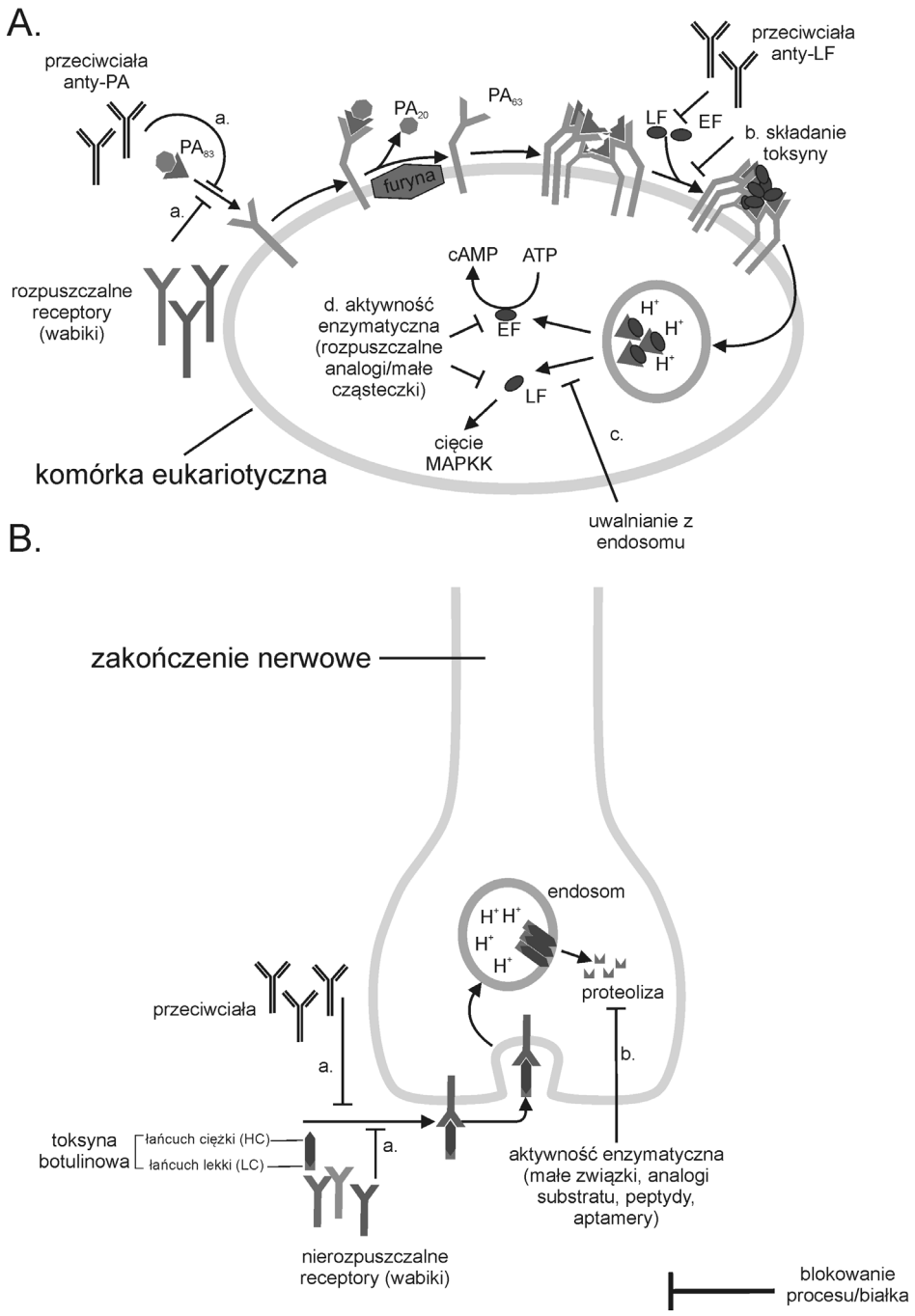


Ryc. 3. Schemat budowy fimbrii adhezyjnych uropatogennych *Escherichia coli* (fimbrie typu PaP).

Zaznaczono potencjalne, testowane możliwości blokowania procesu adhezji: a – różnorodne strategie zahamowania kontaktu obu komórek (rozpuszczalne analogi receptorów lub adhezyn, przeciwciała rozpoznające adhezyny), b – blokowanie kontaktu białka opiekuńczego z podjednostkami budującymi fimbrie (pilicydy), c – blokowanie szlaków syntezy poszczególnych elementów fimbrii.

syny na powierzchni komórek docelowych. Antygen PA, po powiązaniu z odpowiednim receptorem, podlega proteolitycznemu przetwarzaniu przez specyficzną proteazę (furyna). Jego N-fragment PA_{20} oddysocjowuje do środowiska, podczas gdy fragment PA_{63}, połączony nadal z receptorem, ulega oligomeryzacji i dopiero w tej formie wiąże dwa czynniki letalne LF i EF. Powstały kompleks ulega endocytozie. Pod wpływem niskiego pH, w endosomie następuje oddysocjowanie fragmentu PA i jego wbudowanie w błonę. Przez utworzony kanał dwie letalne podjednostki transportowane są do cytozolu komórek ssaczych, gdzie ujawniają się ich aktywności enzymatyczne. Czynnik EF, będący cyklazą adenylanową zależną od poziomu jonów wapnia i stężenia kalmoduliny, doprowadza do wzrostu stężenia cAMP, podczas gdy czynnik LE (proteza zależna od cynku) blokuje kilka szlaków przekazywania sygnału na drodze proteolitycznego cięcia MAPKK (kinazy kinaz aktywowanych przez mitogeny). Wspólne działanie obu tych czynników doprowadza do śmierci komórek. Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach doprowadziły do poznania struktur wszystkich podjednostek toksyny, identyfikacji jej receptorów, poznania mechanizmów oddziaływania toksyny z receptorami oraz wewnątrzkomórkowych aktywności jej podjednostek (Friebe i współaut. 2016). Jak dotąd, jedyną terapią antytoksynową jest bierna immunizacja (przeciwciała anty-PA). Dopuszczony przez amerykańską agencję FDA w 2012 r. nowy lek Raxibacumb (GlaxoSmithKline) jest jedynym lekiem dopuszczonym do użycia, ze względów etycznych, bez przeprowadzenia badań klinicznych. Postęp biologii molekularnej umożliwił badania (strategia zwana RDD; ang. rational drug design), w których celem działania leków są wszystkie podjednostki toksyny i wszystkie etapy oddziaływania toksyny z komórkami eukariotycznymi (wiązanie PA z receptorami, przetwarzanie PA przez furynę, oligomeryzacja PA, wiąza-

nie EF i LF z PA, proces endocytozy, uwalnianie EF i LF z endosomu, aktywność enzymatyczna EF i LF) (Ryc. 4A). Szczegółowy opis takich badań przedstawiono np. w pracy NESTOROVICH i BEZRUKOV (2014). Wiązanie PA z receptorami można zahamować co najmniej na trzy sposoby, stosując przeciwciała wiążące domenę PA, blokując receptory lub stosując tzw. wabiki, w tym przypadku rozpuszczalne fragmenty białek receptorowych wyłapujące podjednostkę PA. Stosując strategię HTS i technologię FRET (ang.



Ryc. 4. Potencjalne leki antytoksynowe.

(A) – toksyna *Bacillus anthracis*: a – blokowanie kontaktu z receptorami (przeciwciała, rozpuszczalne receptory tzw. wabiki), b – blokowanie tworzenia kompleksu oligomeru PA z podjednostkami LF (lethalfactor) i EF (edemafactor), c – blokowanie uwalniania podjednostek LE i EF z endosomu, d – blokowanie aktywności enzymatycznej podjednostek LF i EF (małe cząsteczki niepeptydowe, peptydy analogi substratów). (B) – toksyna *Clostridium botulinum*: a – blokowanie kontaktu z receptorami (przeciwciała, rozpuszczalne receptory tzw. wabiki), b – blokowanie aktywności enzymatycznej (małe cząsteczki niepeptydowe, peptydy analogi substratu, aptamery).

fluorescencje rezonans energy transfer) do monitorowania procesu zidentyfikowano trzy małe cząsteczki blokujące oddziaływanie PA z receptorami. Funkcja receptorów toksyny nie jest znana, ale wiadomo, że obserwuje się ich nadekspresję w komórkach endotelium przechodzących proces angiogenezy. Tak więc nie jest wykluczone, że zidentyfikowane małe cząsteczki znajdą też zastosowanie w terapiach antynowotworowych. Analiza aktywności punktowych mutantów czynnika PA i procesu jego wbudowywania się w błonę endosomu pozwoliła na identyfikację związków blokujących uwalnianie czynników EF i LF do cytozolu. Rozwiązanie struktur EF i LF pozwoliło na poszukiwanie związków blokujących ich katalityczne domeny i jednocześnie zdolnych do przeniknięcia do wnętrza komórki eukariotycznej (NESTOROVICH i BEZRUKOV 2014).

Toksyna botulinowa (BoNT) jest neurotoksyną wytwarzaną przez beztlenowe laseczki *Clostridium botulinum*, zaklasyfikowaną przez CDC (ang. Centers for Disease Control) do kategorii A niebezpiecznych czynników biologicznych. Szczepy *C. botulinum* produkują siedem serologicznych typów toksyn (A-G), z czego trzy: BoNTA, B i E, są najczęstszymi przyczynami ludzkiego botulizmu. Do zatrucia dochodzi głównie przez spożycie pożywienia zanieczyszczonego toksyną. Jedynie w wypadku tzw. dziecięcego botulizmu zatrucie wywołane jest przez żywe bakterie, a toksyna produkowana jest w przewodzie pokarmowym dziecka. Toksyna jest metaloproteazą zależną od cynku, a celem jej działania są białka SNARE (ang. N-ethylmaleimide-sensitive fusion proteins), których aktywność jest niezbędna dla uwalniania neurotransmiterów. Toksyna jest produkowana jako pojedynczy łańcuch aminokwasowy zawierający trzy domeny: (1) odpowiedzialną za wiązanie receptorów, (2) odpowiedzialną za translokację do komórki docelowej i (3) o aktywności katalitycznej. W przewodzie pokarmowym występuje jako wieloskładnikowy kompleks białkowy PTC (ang. progenitur toxin complex) złożony z toksyny i chroniących ją przed degradacją białek NAP (ang. non-toxic neurotoxin associated proteins). W komórkach docelowych toksyna jest proteolitycznie przekształcana do łańcucha ciężkiego HC (ang. heavy chain) i LC (ang. light chain). Ten drugi, o aktywności proteazowej, jest uwalniany z endosomu. Podobnie jak w wypadku toksyny wąglika, znamy już strukturę toksyny, strukturę łańcucha LC powiązanego z substratem, jak i strukturę odpowiednich receptorów (ROSSETTO i współaut. 2014). Jedyną dostępną terapią w wypadku zatrucia toksyną jest podanie, przeważnie końskich, przeciwciał antytoksynowych. Jedynie w wypadku dziecięcego botulizmu, aby ograniczyć skutki uboczne stosowania zwierzęcej surowicy, podawane są przeciwciała otrzymane przez uodparnianie wolontariuszy toksoidem (toksyna pozbawiona aktywności). Terapia przy użyciu przeciwciał musi być zastosowana bardzo szybko, nim toksyna wniknie do komórek. W prowadzonych w wielu laboratoriach badaniach poszukuje się możliwości zablokowania aktywności BoNT na każdym etapie jej działania: wiązania z receptorami, translokacji, uwalniania z endosomu czy zablokowania aktywności proteazowej (Ryc. 4B). Wydaje się, że zablokowanie aktywności BoNT, gdy znajduje się ona w środowisku, jest stosunkowo łatwo osiągalne, podczas gdy zahamowanie jej aktywności wewnątrz komórek nerwowych będzie wymagało opracowania strategii transportu potencjalnego leku do wnętrza komórki. Po poznaniu mechanizmu działania toksyny przetestowano wiele krótkich peptydów działających jako kompetycyjne inhibitory, współzawodniczące z substratem o miejsce wiązania enzymu. Pozytywne rezultaty otrzymano także po zastosowaniu strategii przeszukiwania bibliotek małych peptydów z użyciem metody „Phage-Display". Inna strategia to przeszukiwanie bibliotek małych, niepeptydowych cząsteczek w poszukiwaniu związków blokujących endopeptydazową aktywność toksyny. W tych badaniach jako substrat stosowane są krótkie syntetyczne peptydy, a metodą pomiaru jest analiza fluorescencji. W poszukiwaniu nowych skutecznych inhibitorów BoNT testowane są także biblioteki aptamerów (krótkie oligonukleotydy) charakteryzujących się wysoką specyficznością w stosunku do celu działania. Stosowana strategia nosi nazwę SELEX (ang. systematic evolution of ligands through exponential enrichment). Ciężki łańcuch toksyny HC, odpowiedzialny za rozpoznawanie receptorów, wydaje się być doskonałym nośnikiem zdolnym do transportu potencjalnych leków do komórek nerwowych. Testowane są też związki potencjalnie blokujące wiązanie toksyny z receptorami („ulepszone" przeciwciała, związki naśladujące strukturę receptora) lub jej przekształcanie (CAI i SINGH 2007, KIRIS i współaut. 2014).

INHIBITORY GLOBALNYCH PROCESÓW KOMÓREK BAKTERYJNYCH

INHIBITORY POTRANSLACYJNYCH MODYFIKACJI BIAŁEK

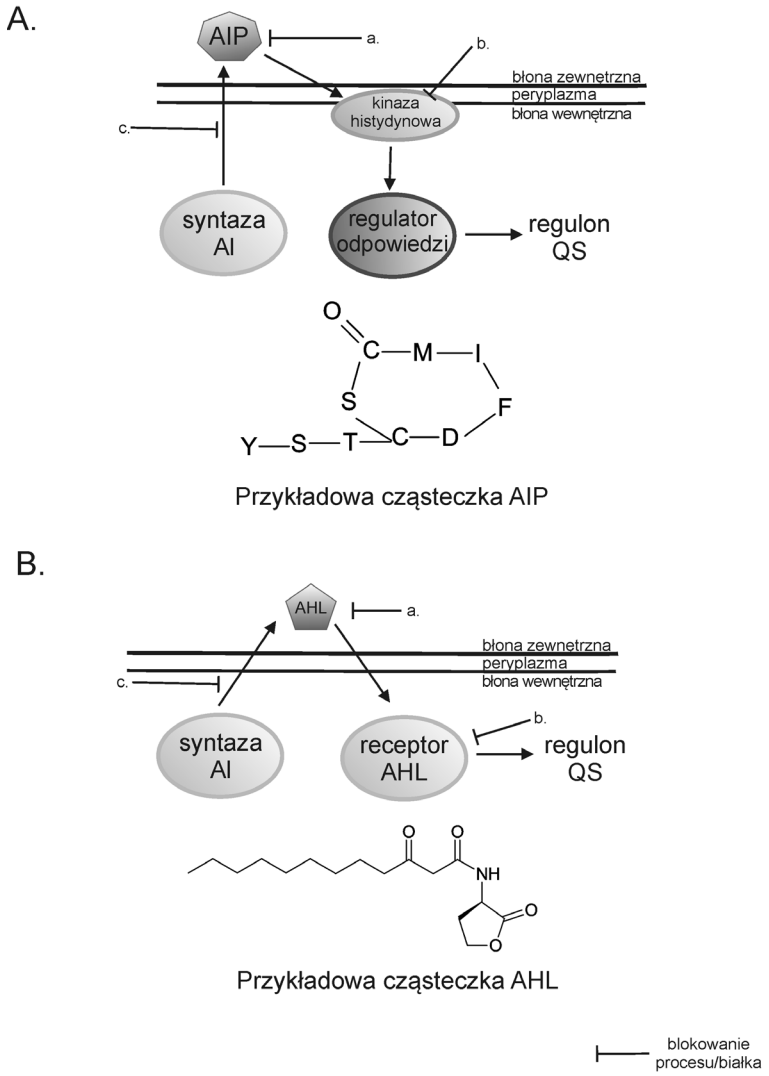
Potranslacyjne modyfikacje białek są istotnym procesem biologicznym, decydującym o strukturze i stabilności, a w konsekwencji o funkcjonalności wielu protein.

Jedną z najpospolitszych modyfikacji jest wprowadzanie mostków disiarczkowych, polegające na utlenianiu grup tiolowych reszt cysteinowych z jednoczesnym uwolnieniem dwu elektronów. Wiele czynników wirulencji licznych bakterii patogennych to białka pozacytoplazmatyczne, zawierające więcej niż jedną resztę cysteinową. Dla osiągnięcia właściwej struktury wymagają wprowadzania mostków disiarczkowych pomiędzy grupami -SH reszt cysteinowych. Tak więc, ta potranslacyjna modyfikacja często decyduje o patogenności drobnoustrojów (LASICA i JAGUSZTYN-KRYNICKA 2007, HERAS i współaut. 2009). W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces ten ma miejsce w utleniających warunkach panujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Generowanie mostków disiarczkowych jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania białek. Chociaż *in vitro* zachodzi on spontanicznie, *in vivo* katalizowany jest przez zespół białek Dsb (ang. disulfide bond). W komórkach *E. coli* białka Dsb działają w dwóch szlakach: utleniania (EcDsbA, EcDsbB) i izomeryzacji/redukcji (EcDsbC i EcDsbD). W szlaku utleniania pomiędzy resztami cystein w białkach tworzone są wiązania disiarczkowe, natomiast w szlaku izomeryzacji/redukcji naprawiane są błędy szlaku utleniania (BERKMEN 2012). Główna oksydoreduktaza wprowadzająca mostki disiarczkowe do białek w komórkach wielu gatunków bakterii to monomeryczne białko DsbA, którego struktura zawiera charakterystyczną dla oksydoreduktaz tiolowosiarczkowych domenę tioredoksyny (TRX). Za reoksydację enzymu DsbA odpowiedzialne jest EcDsbB, integralne białko błony cytoplazmatycznej, które zawiera cztery transbłonowe α-helisy (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne (P1, P2). W każdej z pętli tworzony jest mostek disiarczkowy. Z DsbB elektrony przekazywane są na ostateczne receptory przez kompleksy białkowe wchodzące w skład łańcucha oddechowego (BERKMEN 2012). Poznanie struktur wielu białek DsbA i poznanie szczegółów mechanizmu oddziaływania DsbA z DsbB umożliwiło planowanie inhibitorów tego procesu (INABA i ITO 2008, SHOULDICE i współaut. 2011). Jako cel działania wytypowano białko DsbB ponieważ, w przeciwieństwie do DsbA należącego do rodziny tioredoksyn, jego homologi nie są obecne w komórkach eukariotycznych (HALILI i współaut. 2015, LANDETA i współaut. 2015). W badaniach prowadzonych przez grupę Landeta, w których przebadano bibliotekę zawierającą ponad 50.000 związków, zastosowano interesującą metodę selekcji, a mianowicie szczep *E. coli* kodujący genetycznie zmienioną wersję enzymu beta-galaktozydazy. Enzym jest transportowany do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie jest inaktywowany przez wprowadzenie mostków disiarczkowych. Zidentyfikowano sześć inhibitorów aktywności DsbB o podobnej strukturze (obecność pierścienia pirydazynowego), które następnie przebadano w testach biochemicznych. Wykazano, że jeden ze związków wiąże się kowalencyjnie z kompleksem DsbA-DsbB, uniemożliwiając przekazywanie elektronów poprzez łańcuch oddechowy, a tym samym blokując reoksydację DsbA.

Liczba zsekwencjonowanych genomów stale wzrasta, a ich analizy ujawniają, że systemy Dsb funkcjonujące w komórkach mikroorganizmów są różnorodne i często odmienne od dokładnie scharakteryzowanego systemu Dsb modelowej bakterii *E. coli* (HATAHET i współaut. 2014). Można przypuszczać, że i inne białka Dsb, typowe dla organizmów prokariotycznych, mogą być celem nowych leków (MCMAHON i współaut. 2014).

INHIBITORY UKŁADÓW DWUSKŁADNIKOWYCH

W komórkach bakteryjnych, które muszą stale reagować na zmiany warunków otoczenia i warunki stresu fizjologicznego, najczęściej stosowanym mechanizmem przekazywania informacji, pozwalającym wyczuć sygnał i przełożyć go na proces modulacji transkrypcji odpowiednich genów, jest tzw. system dwuskładnikowy (ang. two component system, TCS). W najprostszym układzie system składa się z dwu białek: białka sensorowego o aktywności kinazy (ang. histidine kinase, HK) odbierającego sygnał i białka regulatorowego (ang. response regulator, RR) posiadającego zdolność do wiązania z DNA i pełniącego rolę aktywatora lub represora transkrypcji, w zależności od rodzaju nukleotydowych sekwencji promotorowych. HK funkcjonują jako dimery. Przekazanie informacji polega na autofosforylacji histydyn HK, w procesie, gdzie dawcą grupy fosforanowej jest ATP, i następnym transferze grupy fosforanowej na kwas asparaginowy białka regulatorowego, co doprowadza do zmiany jego konformacji i umożliwia wiązanie z odpowiednimi sekwencjami nukleotydowymi w regionach promotorowych. Defosforylacja powoduje powrót systemu do stanu wyjściowego. W komórkach mikroorganizmów funkcjonuje często wiele białek układów dwuskładnikowych, które dodatkowo mogą komunikować się między sobą, co zapewnia olbrzymią precyzję odpowiedzi. Zarówno szybkość reakcji tego systemu, rodzaj regulowanych procesów, jak i liczba systemów TCS funkcjonujących w komórce charakteryzują się olbrzymią różnorodnością. Ich aktywność w niektórych gatunkach mikroorganizmów jest niezbędna do przeżycia komórki, podczas gdy w innych warunkuje wytwarza-



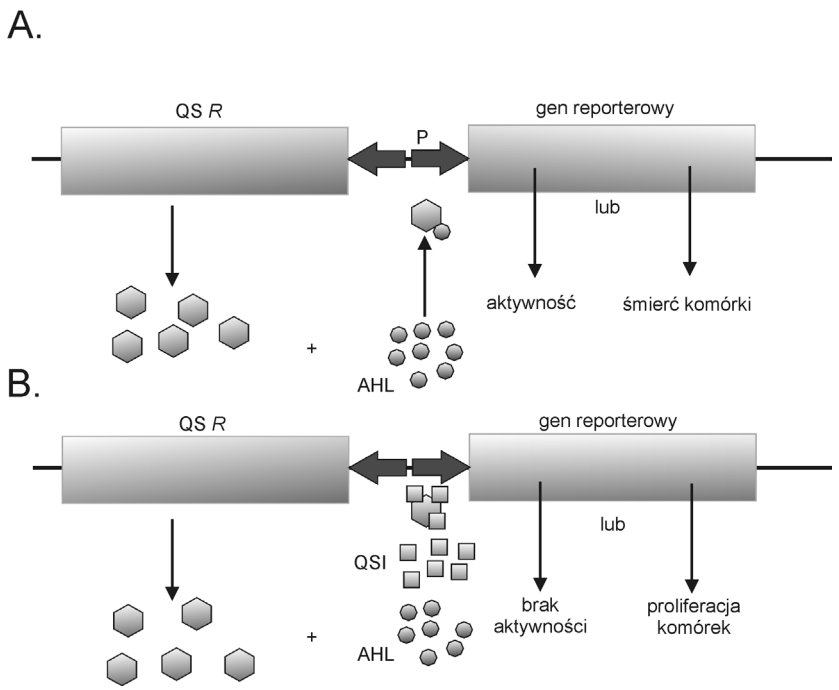
Ryc. 5. Uproszczony schemat działania systemu wyczuwania zagęszczenia QS (quorum sensing):

A – bakterii Gram-dodatnich, B – bakterii Gram-ujemnych. Potencjalne możliwości zablokowania aktywności systemu: Aa – blokowanie rozpoznania AIP przez białko sensorowe będące kinazą histydynową (przeciwciała, analogi AIP), Ab – blokowanie aktywności białka sensorowego, Ac – blokowanie procesu syntezy AIP, Ba – degradacja AHL, Bb – blokowanie połączenia AHL z białkiem regulatorowym, Bc – blokowanie syntezy AHL. AIP – peptydy autoindukcyjne (ang. autoinducing peptide), AHL – laktony N-acylohomoseryny.

nie czynników wirulencji, ich transport na zewnątrz komórki czy jest odpowiedzialna za oporność na antybiotyki, np. wankomycynę. Tak więc, w zależności od patogenu potencjalne inhibitory systemu TCS mogą mieć, podobnie jak antybiotyki, działanie bakteriobójcze lub tylko blokować procesy wirulencji. Dotąd opisano około stu inhibitorów bakteryjnych systemów TCS, należących do różnych klas związków chemicznych. Ich celem działania są głównie białka sensorowe, a dokładniej, ich domeny katalityczne wiążące ATP, domeny dimeryzacyjne lub domeny odpowiedzialne za autofosforylację (Gotoh i współaut. 2010, Bem i współaut. 2015, Velikova i współaut. 2016).

INHIBITORY PROCESU WYCZUWANIA ZAGĘSZCZENIA

Ciekawym zjawiskiem jest proces komunikacji komórek bakteryjnych między sobą, nazwany zjawiskiem wyczuwania gęstości/liczebności, QS. Polega on na zdolności do wytwarzania, uwalniania i wyczuwania obecności cząsteczek sygnalizacyjnych, tzw. autoinduktorów. Generalnie, autoinduktorami u bakterii Gram-ujemnych są drobnocząsteczkowe związki, głównie, choć nie tylko, laktony N-acylohomoseryny (AHL), zdolne do przenikania przez osłony komórkowe i modulujące aktywność cytoplazmatycznych białek regulatorowych. Takie systemy QS należą do typu LuxI/LuxR, jako homologiczne



Ryc. 6. Strategie identyfikacji inhibitorów systemu wyczuwania zagęszczenia (QS, quorum sensing). Obserwowany efekt jest uzależniony od użytego genu reporterowego. QSR – regulator systemu QS; QSI – inhibitor; P – promotor; AHL – laktony N-acylohomoseryny

do pierwszego odkrytego, funkcjonującego w komórkach morskiej bakterii *Vibrio fischeri*, gdzie białko LuxI to syntaza AHL, a LuxR białko regulatorowe. U bakterii Gram-dodatnich rolę autoinduktorów pełnią krótkie peptydy sygnałowe AIP (ang. autoinducing peptide), aktywujące białka sensorowe układów dwuskładnikowych. Mikroorganizmy obecne w populacji reagują na obecność autoinduktorów, wyczuwając gęstości populacji i dostosowują procesy transkrypcji genów do fazy wzrostu populacji. Duża liczba komórek w populacji skutkuje wysokim stężeniem autoinduktorów w środowisku i „włączeniem" stosownej odpowiedzi komórek (RUTHERFORD i BASSLER 2012, KALIA 2013). Zjawisko QS reguluje wiele procesów, między innymi wirulencję, zdolność do koniugacji i naturalnej transformacji, tworzenie biofilmu czy też produkcję wtórnych metabolitów. Przeprowadzone ostatnio analizy wykazały, że tworzenie biofilmu odgrywa kluczową rolę w rozwoju objawów chorobowych ponad 60% chorób zakaźnych. Zablokowanie procesu wyczuwania zagęszczenia skutkuje często zahamowaniem tworzenia biofilmów, co „ułatwia" działanie układu odpornościowego lub poprawia skuteczność działania antybiotyków, a tym samym przyczynia się do eradykacji patogenu. Inhibitory procesu QS mogą działać na każdym jego etapie: blokować powstawanie autoinduktorów, ich sekrecję czy interakcję z białkami regulatorowymi (Ryc. 5). Badana jest też skuteczność związków degradujących autoinduktory (ang. quorum quenching, QQ). Użycie przeciwciał lub związków będących analogami autoinduktorów, tzw. wabików (ang. decoy), skutkuje zablokowaniem rozpoznania autoinduktorów przez odpowiednie białka regulatorowe, cytoplazmatyczne lub błonowe. Badanie aktywności nowych cząsteczek sygnalizacyjnych lub inhibitorów wymagało przygotowania odpowiednich szczepów, zwanych biosensorami, do monitorowania przebiegu procesu. Zawierają one przeważnie geny reporterowe (geny operonu *lux* warunkujące bioluminescencje, gen *lacZ* kodujący β-galaktozydazę czy gen *gfp* kodujący białko zielonej fluorescencji), sklonowane pod kontrolą promotora regulowanego przez system QS, i pozbawione są możliwości produkcji autoinduktorów. Tak więc, proces zależny jest od cząsteczek egzogennych. Ciekawą strategią analizy skuteczności działania inhibitorów jest zastosowanie genów kodujących produkt toksyczny dla komórki też wyrażanych z promotora systemu QS (Ryc. 6). W tym układzie dodanie autoinduktora skutkuje śmiercią komórki, podczas gdy dodanie autoinduktora i inhibitora, skutecznie blokującego oddziaływanie autoinduktora z białkiem regulatorowym, warunkuje jej przeżycie (RASMUSSEN i GIVSKOV 2006, BRACKMAN i COENYE 2015). Najwięcej uwagi poświęcono w ostatnich latach systemom QS dwu istotnych medycznie

ludzkich patogenów: *S. aureus* i *P. aeruginosa*. W komórkach *P. aeruginosa* funkcjonują trzy współdziałające ze sobą systemy QS, dwa typu LuxI/LuxR i trzeci o odmiennym sposobie działania, zwany PQS (ang. *Pseudomonas* quinolone signal). Regulują one aktywność około 10% genomu tego patogenu. Nadrzędną rolę pełni cytoplazmatyczne białko regulatorowe LasR (homolog LuxR) i to ono jest głównym obiektem badań mających na celu opracowanie nowych leków. W komórkach *S. aureus* funkcjonuje kanoniczny, charakterystyczny dla bakterii Gram-dodatnich system QS, gdzie AIP rozpoznawane są przez białko sensorowe układu dwuskładnikowego. Elementy tego układu kodowane są przez geny locus *agr*. Aktywacja QS prowadzi, poprzez skomplikowany mechanizm, do obniżenia produkcji zlokalizowanych na powierzchni komórki czynników wirulencji, a podwyższenia ekspresji genów kodujących wydzielane do środowiska białka np. α-toksynę. Głównym celem działania potencjalnych inhibitorów (analogi naturalnych AIP patogenu lub przeciwciała) jest białko sensorowe AgrC (kinaza histydynowa) (Rutherford i Bassler 2012).

PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono tylko wybrane nowe, inne niż antybiotyki, strategie antybakteryjne. Nie omawiano np. terapii bakteriofagowych, terapii fotodynamicznych czy zastosowania peptydów antybakteryjnych. W ostatnich latach coraz dokładniej rozumiemy mechanizmy oddziaływań bakterii patogennych z gospodarzem. Ta wiedza, w połączeniu z rozwojem metod stosowanych *in silico*, automatyzacją procesu „przeszukiwania" bibliotek potencjalnych inhibitorów procesów wirulencji oraz poznaniem struktur dużej liczby czynników wirulencji doprowadziła do identyfikacji wielu potencjalnych leków: głównie małych cząsteczek chemicznych, peptydów, aptamerów czy „ulepszonych" przeciwciał. Najszybszy postęp poczyniono, po 11 wrześniu 2001 r., w opracowywaniu nowych leków antytoksynowych, co ma ustrzec ludzkość przed skutkami ataku bioterrorystycznego. Jednak skuteczność wielu inhibitorów była, jak dotąd, analizowana wyłącznie w laboratoriach naukowych, głównie w eksperymentach *in vitro*. Często jeszcze nie udało się dokładnie określić mechanizmu działania konkretnych związków. Efekty działania tylko nielicznej grupy potencjalnych inhibitorów procesów wirulencji analizowane było na modelach zwierzęcych, bardzo niewiele jest w początkowej fazie badań klinicznych. Aby wygrać wojnę z bakteriami patogennymi, bezwzględnie należy skonsolidować wysiłki międzynarodowych środowisk naukowych, agencji światowych i dużych firm farmaceutycznych. Trzeba pamiętać, że badania kliniczne trwają zwykle kilka lat i, co więcej, tylko niewielki procent testowanych potencjalnych leków spełnia wymagane kryteria i jest dopuszczona do stosowania w terapiach.

Streszczenie

Stale rosnąca liczba szczepów bakterii patogennych opornych na stosowane w terapiach ludzi antybiotyki stanowi zagrożenie dla ludzkości. Zgodnie z danymi Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób tylko w Europie odnotowywanych jest rocznie około 25.000 zgonów z powodu chorób będącymi konsekwencją infekcji powodowanych przez mikroorganizmy oporne na antybiotyki. Pomiędzy rokiem 1930 a 1962 zidentyfikowano i wprowadzono do terapii ponad 20 klas antybiotyków. Od tego czasu zarejestrowano tylko dwie nowe klasy antybiotyków. Skuteczna walka z chorobami zakaźnymi wymaga opracowania i wprowadzenia na rynek nowych klas leków o odmiennych od antybiotyków mechanizmach działania. Praca przeglądowa prezentuje najnowsze osiągnięcia dotyczące identyfikacji nowej klasy leków antybakteryjnych, tzw. leków blokujących procesy wirulencji. Omówione są zarówno leki blokujące konkretne czynniki wirulencji, jak i te, których celem działania są globalne procesy zachodzące w komórkach, istotne także dla procesów patogenezy.

LITERATURA

Aberg V., Fallman E., Axner O., Uhlin B. E., Hultgren S. J., Almqvist F., 2007. *Pilicides regulate pili expression in E. coli without affecting the functional properties of the pilus rod.* Mol. Biosyst. 3, 214-218.

Becattini S., Taur Y., Pamer E. G., 2016. *Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease.* Trends. Mol. Med. 22, 458-478.

Bem A. E., Velikova N., Pellicer M. T., Baarlen P., Marina A., Wells J. M., 2015. *Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets.* ACS Chem. Biol. 10, 213-224.

Berkmen M., 2012. *Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli.* Protein Expr. Purif. 82, 240-251.

Boucher H. W., Talbot G. H., Bradley J. S., Edwards J. E., Gilbert D., Rice L. B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J., 2009. *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America.* Clin. Infect. Dis. 48, 1-12.

Brackman G., Coenye T., 2015. *Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents.* Curr. Pharm. Des. 21, 5-11.

Cai S., Singh B. R., 2007. *Strategies to design inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxins.* Infect Disord. Drug Targets. 7, 47-57.

Cdcp (Center for Disease Control and Prevention), 2013. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.* http://cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013.

Chagnot C., Zorgani M. A., Astruc T., Desvaux M., 2013. *Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective.* Front. Microbiol. 4, 303.

COATES A. R., HALLS G., HU Y., 2011. *Novel classes of antibiotics or more of the same?* Br. J. Pharmacol. 163, 184-194.

FALAGAS M. E., KASIAKOU S. K., 2005. *Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*. Clin. Infect. Dis. 40, 1333-1341.

FRIEBE S., VAN DER GOOT F. G., BURGI J., 2016. *The ins and outs of anthrax toxin*. Toxins (Basel). 8, 1-15

GALAN J. E., LARA-TEJERO M., MARLOVITS T. C., WAGNER S., 2014. *Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells*. Annu. Rev. Microbiol. 68, 415-438.

GAUTHIER A., ROBERTSON M. L., LOWDEN M., IBARRA J. A., PUENTE J. L., FINLAY B. B., 2005. *Transcriptional inhibitor of virulence factors in enteropathogenic Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4101-4109.

GOTOH Y., EGUCHI Y., WATANABE T., OKAMOTO S., DOI A., UTSUMI R., 2010. *Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria*. Curr. Opin. Microbiol. 13, 232-239.

HALILI M. A., BACHU P., LINDAHL F., BECHARA C., MOHANTY B., REID R. C., SCANLON M. J., ROBINSON C. V., FAIRLIE D. P., MARTIN J. L., 2015. *Small molecule inhibitors of disulfide bond formation by the bacterial DsbA-DsbB dual enzyme system*. ACS Chem. Biol. 10, 957-964.

HATAHET F., BOYD D., BECKWITH J., 2014. *Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design*. Biochim. Biophys. Acta. 1844, 1402-1414.

HERAS B., SHOULDICE S. R., TOTSIKA M., SCANLON M. J., SCHEMBRI M. A., MARTIN J. L., 2009. *DSB proteins and bacterial pathogenicity*. Nat. Rev. Microbiol. 7, 215-225.

HOLMES A. H., MOORE L. S., SUNDSFJORD A., STEINBAKK M., REGMI S., KARKEY A., GUERIN P. J., PIDDOCK L. J., 2016. *Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance*. Lancet. 387, 176-187.

IDSA (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA), 2010. *The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020*. Clin. Infect. Dis. 50, 1081-1083.

INABA K., ITO K., 2008. *Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine*. Biochim. Biophys. Acta. 1783, 520-529.

KALIA V. C., 2013. *Quorum sensing inhibitors: an overview*. Biotechnol Adv. 31, 224-245.

KAUPPI A. M., NORDFELTH R., UVELL H., WOLF-WATZ H., ELOFSSON M., 2003. *Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in Yersinia*. Chem. Biol. 10, 241-249.

KEYSER P., ELOFSSON M., ROSELL S., WOLF-WATZ H., 2008. *Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria*. J. Intern. Med. 264, 17-29.

KINOSHITA M., KATO H., YASUMOTO H., SHIMIZU M., HAMAOKA S., NAITO Y., AKIYAMA K., MORIYAMA K., SAWA T., 2016. *The prophylactic effects of human IgG derived from sera containing high anti-PcrV titers against pneumonia-causing Pseudomonas aeruginosa*. Hum. Vaccin. Immunother., 1-14.

KIRIS E., BURNETT J. C., KANE C. D., BAVARI S., 2014. *Recent advances in botulinum neurotoxin inhibitor development*. Curr. Top. Med. Chem. 14, 2044-2061.

KLEMM P., VEJBORG R. M., HANCOCK V., 2010. *Prevention of bacterial adhesion*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88, 451-459.

KOSTYANEV T., BONTEN M. J., O'BRIEN S., STEEL H., ROSS S., FRANCOIS B., TACCONELLI E., WINTERHALTER M., STAVENGER R. A., KARLEN A., HARBARTH S., HACKETT J., JAFRI H. S., VUONG C., MACGOWAN A., WITSCHI A., ANGYALOSI G., ELBORN J. S., DEWINTER R., GOOSSENS H., 2016. *The Innovative Medicines Initiative's New Drugs for Bad Bugs programme: European public-private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance*. J. Antimicrob. Chemother. 71, 290-295.

KRACHLER A. M., ORTH K., 2013. *Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy*. Virulence 4, 284-294.

LANDETA C., BLAZYK J. L., HATAHET F., MEEHAN B. M., ESER M., MYRICK A., BRONSTAIN L., MINAMI S., ARNOLD H., KE N., RUBIN E. J., FURIE B. C., FURIE B., BECKWITH J., DUTTON R., BOYD D., 2015. *Compounds targeting disulfide bond forming enzyme DsbB of Gram-negative bacteria*. Nat. Chem. Biol. 11, 292-298.

LASICA A. M., JAGUSZTYN-KRYNICKA E. K., 2007. *The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis*. FEMS Microbiol. Rev. 31, 626-636.

LILLINGTON J., GEIBEL S., WAKSMAN G., 2014. *Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili*. Biochim. Biophys. Acta. 1840, 2783-2793.

LING L. L., SCHNEIDER T., PEOPLES A. J., SPOERING A. L., ENGELS I., CONLON B. P., MUELLER A., SCHABERLE T. F., HUGHES D. E., EPSTEIN S., JONES M., LAZARIDES L., STEADMAN V. A., COHEN D. R., FELIX C. R., FETTERMAN K. A., MILLETT W. P., NITTI A. G., ZULLO A. M., CHEN C., LEWIS K., 2015. *A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance*. Nature. 517, 455-459.

MAGIORAKOS A. P., SRINIVASAN A., CAREY R. B., CARMELI Y., FALAGAS M. E., GISKE C. G., HARBARTH S., HINDLER J. F., KAHLMETER G., OLSSON-LILJEQUIST B., PATERSON D. L., RICE L. B., STELLING J., STRUELENS M. J., VATOPOULOS A., WEBER J. T., MONNET D. L., 2012. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin. Microbiol. Infect. 18, 268-281.

MARESSO A. W., SCHNEEWIND O., 2008. *Sortase as a target of anti-infective therapy*. Pharmacol. Rev. 60, 128-141.

MCMAHON R. M., PREMKUMAR L., MARTIN J. L., 2014. *Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors*. Biochim. Biophys. Acta. 1844, 1391-1401.

MCSHAN A. C., DE GUZMAN R. N., 2015. *The bacterial type III secretion system as a target for developing new antibiotics*. Chem. Biol. Drug Des. 85, 30-42.

NEGREA A., BJUR E., YGBERG S. E., ELOFSSON M., WOLF-WATZ H., RHEN M., 2007. *Salicylidene acylhydrazides that affect type III protein secretion in Salmonella enterica serovar typhimurium*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2867-2876.

NESTOROVICH E. M., BEZRUKOV S. M., 2014. *Designing inhibitors of anthrax toxin*. Expert. Opin. Drug Discov. 9, 299-318.

NORDFELTH R., KAUPPI A. M., NORBERG H. A., WOLF-WATZ H., ELOFSSON M., 2005. *Small-mol-*

ecule inhibitors specifically targeting type III secretion. Infect Immun. 73, 3104-3114.
NORMARK B. H., NORMARK S., 2002. *Evolution and spread of antibiotic resistance*. J. Intern. Med. 252, 91-106.
NORMARK S., NILSSON C., NORMARK B. H., 2005. *Microbiology. A pathogen attacks while keeping up defense*. Science. 307, 1211-1212.
NORRBY S. R., NORD C. E., FINCH R., 2005. *Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health*. Lancet Infect. Dis. 5, 115-119.
PINKNER J. S., REMAUT H., BUELENS F., MILLER E., ABERG V., PEMBERTON N., HEDENSTROM M., LARSSON A., SEED P., WAKSMAN G., HULTGREN S. J., ALMQVIST F., 2006. *Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 17897-17902.
PORTALIOU A. G., TSOLIS K. C., LOOS M. S., ZORZINI V., ECONOMOU A., 2016. *Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine*. Trends Biochem Sci. 41, 175-189.
RASMUSSEN T. B., GIVSKOV M., 2006. *Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs*. Int. J. Med. Microbiol. 296, 149-161.
RICE L. B., 2008. *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J. Infect. Dis. 197, 1079-1081.
ROSSETTO O., PIRAZZINI M., MONTECUCCO C., 2014. *Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights*. Nat. Rev. Microbiol. 12, 535-549.
RUTHERFORD S. T., BASSLER B. L., 2012. *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543102/
SHOULDICE S. R., HERAS B., WALDEN P. M., TOTSIKA M., SCHEMBRI M. A., MARTIN J. L., 2011. *Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst*. Antioxid. Redox Signal. 14, 1729-1760.
VELIKOVA N., FULLE S., MANSO S., MECHKARSKA M., FINN P., CONLON J. M., OGGIONI M. R., WELLS J. K., MARINA A., 2016. *Putative histidine kinase inhibitors with antibacterial effect against multi-drug resistant clinical isolates identified by in vitro and in silico screens*. Scientific Reports. 6; doi: 10.1038/srep26085.
VENTOLA C. L., 2015a. *The antibiotic resistance crisis. Part 1. Causes and threats*. Pharmacy Tcherap. 40, 277-283.
VENTOLA C. L., 2015b. *The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents*. Pharmacy Tcherap. 40, 344-352.
ZALEWSKA-PIATEK B. M., 2011. *Urinary tract infections of Escherichia coli strains of chaperone-usher system*. Pol. J. Microbiol. 60, 279-285.

KOSMOS Vol. 66, 1, 93–107, 2017

ELŻBIETA KATARZYNA JAGUSZTYN-KRYNICKA, MAGDALENA GRZESZCZUK, PATRYCJA KOBIERECKA

Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, E-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

NEW STRATEGIES TO COMBAT INFECIOUS DISEASES – ANTIVIRULENCE DRUGS

Summary

The rapid emergence of resistant bacteria occurring in many parts of the world constitutes an increasing risk to public health. According to European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), in 2009 infections caused by a subset of resistant bacteria were responsible for about 25 000 deaths in Europe. The issue of resistance concerns both gram-positive and gram-negative pathogens that cause infections in the hospitals and in the community. The success in combat against infectious diseases depends upon development of effective anti-infective drugs. More than 20 novel classes of antibiotics were introduced into market between 1930 and 1962. Since then only two new classes of antibiotics have been approved for clinical use. This review presents recent advances toward the development of alternative medicines to classical antibiotics, antivirulence drugs, and highlights their benefits and disadvantages over conventional antibacterials. There are described both potential drugs aimed at single targets as well as those able to inhibit global cellular processes essential for virulence.