

Transkrypt: Inspirowana fagami identyfikacja molekularnych celów leków przeciwbakteryjnych

Slajd 1

Witajcie na elektronicznym wykładzie poświęconym inspirowanej fagami identyfikacji molekularnych celów leków przeciwbakteryjnych. W pierwszej części wykładu wyjaśnione zostanie dlaczego istnieje ogromna potrzeba poszukiwania nowych celów dla środków przeciwbakteryjnych i czym te cele w zasadzie są. W drugiej części krok po kroku objaśniony zostanie proces poszukiwania tych celów z wykorzystaniem fagów jako źródła inspiracji. Wykład zakończy krótkie omówienie jak molekularne cele przeciwbakteryjne mogą zostać użyte do pozyskania nowych antybiotyków.

Slajd 2

W ostatnich latach doniesienia medialne często skupiają się na problemie rosnącej oporności patogennych bakterii wobec obecnie dostępnych antybiotyków. Oznacza to, że bakterie nie są wrażliwe na dostępne antybiotyki, a tym samym leczenie infekcji bakteryjnych stało się dużo trudniejszym wyzwaniem. Dlatego Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zwróciła się w ostatnim czasie z apelem o pomoc, publikując listę bakterii, dla których istnieje pilne zapotrzebowanie na nowe antybiotyki. Spośród nich *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* należą do najbardziej krytycznej grupy lekoopornych bakterii, dla których poszukiwanie nowych antybiotyków jest szczególnie ważne. Celem stworzenia tej listy jest zachęcenie naukowców do badań nad nowymi antybiotykami, które specyficznie hamują molekularne cele wewnątrz komórek bakterii. Cele rozumiane są tutaj jako białka lub procesy niezbędne bakteriom do przeżycia, jak np. synteza ściany komórkowej czy rybosomy. Co więcej, muszą one być podatne na inhibicję – to znaczy, że musi istnieć możliwość znalezienia antybiotyków oddziałujących na dane białko lub proces i tym samym hamujących wzrost bakterii. Jako naturalni wrogowie bakterii, fagi posiadają toksyczne białka, które podczas infekcji hamują kluczowe dla komórek bakteryjnych procesy komórkowe i zamieniają gospodarza w maszynę produkującą fagi potomne. Te toksyczne białka fagowe zostały wyselekcjonowane w procesie ewolucji, dlatego też są bardzo skuteczne. Identyfikacja bakteryjnych białek i procesów, będących molekularnym celem dla toksycznych białek fagowych oraz naśladowanie ich toksycznego efektu może przyczynić się do rozwoju nowych antybiotyków.

Slajd 3

Poszukiwanie molekularnych celów dla nowych terapeutyków można podzielić na 3 etapy: Pierwszy etap obejmuje sekwencjonowanie genomów fagów specyficznych wobec wybranych bakterii oraz przewidywanie fagowych genów. Drugi – identyfikację genów, których produkty wykazują działanie przeciwbakteryjne i wreszcie ostatni – znalezienie w komórce bakterii molekularnych celów, na które toksyczne produkty tych genów oddziałują. Te trzy etapy zostaną teraz omówione szczegółowo.

Slajd 4

Na początku zostaje wybrany fag, infekujący bakterię, dla której chcemy uzyskać nowy antybiotyk – na przykład fag specyficznie infekujący *Pseudomonas aeruginosa*. Po zebraniu kilku fagów odpowiedniego typu, genomy fagowe są izolowane i określana jest ich sekwencja nukleotydowa. W ostatnim kroku wykorzystuje się narzędzia bioinformatyczne do wytypowania w obrębie zsekwencjonowanych genomów genów kodujących białka fagowe.

Slajd 5

Drugi etap obejmuje sprawdzenie, które z wytypowanych genów fagowych kodują białka toksyczne dla wybranej bakterii. W pierwszym kroku dla każdego z wytypowanych genów fagowych konstruowany jest indywidualnie plazmid ekspresyjny. Jest to mała, kolistą cząsteczka DNA, zawierająca pojedynczy gen fagowy. Następnie konstrukty plazmidowe są wprowadzane do cytoplazmy komórek wybranej bakterii w procesie transformacji. Ostatnim krokiem jest indukcja ekspresji genów fagowych,

skutkująca produkcją białek fagowych w komórkach bakterii. Identyfikacja białek toksycznych dla bakterii opiera się na ocenie wzrostu bakterii w obecności danego białka fagowego w cytoplazmie.

Slajd 6

Ocena wzrostu bakterii w celu identyfikacji toksycznych białek fagowych jest wykonywana w następujący sposób. Dla każdego fagowego genu porównywany jest wzrost bakterii nie produkujących danego białka i bakterii produkujących to białko. Oczekuje się, że bakterie, które jedynie posiadają plazmid, ale nie produkują białek fagowych namnażają się normalnie. Z drugiej strony, dla bakterii produkujących białka fagowe możliwe są dwie opcje. Jeśli bakterie te nadal namnażają się normalnie, produkowane białka nie są toksyczne. W odwrotnym przypadku, gdy białka fagowe są toksyczne, bakterie nie będą namnażały się normalnie. Poprzez przeprowadzenie takiego eksperymentu dla każdego zidentyfikowanego genu fagowego, możliwe jest wybranie tych genów fagowych, które kodują toksyczne dla bakterii białka.

Slajd 7

Jak można na tym etapie znaleźć białka bakteryjne, będące celem zidentyfikowanych toksycznych białek fagowych? Jedną z metod opiera się na koprecypitacji (pull-down assay). W tej metodzie wybrane toksyczne białko fagowe jest wykorzystywane jako przynęta do schwytania bakteryjnego białka-celu. Białko fagowe jest najpierw immobilizowane wewnątrz kolumny. Następnie od góry kolumny wprowadzana jest mieszanina wszystkich białek produkowanych przez interesującą nas bakterię. Podczas wędrówki przez kolumnę, białka bakteryjne mogą oddziaływać z immobilizowanym białkiem fagowym. Te spośród nich, które są celem wybranego białka fagowego, będą zatrzymywane wewnątrz kolumny, podczas gdy pozostałe nie będą zatrzymywane i opuszczą kolumnę. Ostatecznie zatrzymane wewnątrz kolumny białka bakteryjne mogą zostać poddane elucji i zidentyfikowane. Alternatywnie, inne techniki mogą również być wykorzystane do identyfikacji bakteryjnych celów dla toksycznych białek fagowych. Jednym z przykładów jest technika oddziaływań białko-białko „yeast two-hybrid”, której użycie zostało przedstawione w pracy Wagemans *et al.*

Slajd 8

Jak można wykorzystać te bakteryjne białka-cele toksycznych białek fagowych w procesie tworzenia nowego antybiotyku? Proces ten zakłada identyfikację małej cząsteczki, która naśladowałaby działanie toksycznego białka fagowego, czyli wywierała podobny efekt hamujący na bakteryjnym białku-celu. Białka fagowe same w sobie nie mogą być użyte jako antybiotyki, ponieważ białka są szybko rozkładane w procesie trawienia w przewodzie pokarmowym i nie mogą penetrować do wnętrza komórek bakteryjnych. Natomiast małe cząsteczki nie są trawione, a ich niewielki rozmiar pozwala na penetrację i wywołanie toksycznego efektu wewnątrz komórki bakteryjnej.

Slajd 9

Jeśli chcesz dowiedzieć się więcej na temat antybiotykooporności i wykorzystania toksycznych białek fagowych w identyfikacji nowych molekularnych celów dla leków przeciwbakteryjnych, polecamy poniższe pozycje literaturowe. Dziękujemy za udział w tym wykładzie online.