



Amanda Holstad Singleton

Master i bioteknologi og ph.d.-stipendiat ved Institutt for klinisk og molekylær medisin (IKOM), Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), e-post: amanda.singleton@ntnu.no



Marit Otterlei

Professor ved Institutt for klinisk og molekylær medisin på NTNU. Doktorgrad i immunologi og forskningsbakgrunn fra DNA-reparasjon/genomstabilitet.

Nytt verktøy i jakten på nye antibiotika-kandidater

Meticillinresistente gule stafylokokker (MRSA) er utbredt i mange land og kan forårsake alvorlige infeksjoner som er vanskelige å behandle. En studie gjennomført ved Institutt for klinisk og molekylær medisin ved NTNU, tar i bruk en ny metode for å undersøke virkningsmekanismen til to nye antibiotika-kandidater med svært god kombinasjonseffekt mot MRSA.

I Norge kan de fleste infeksjoner enkelt behandles med antibiotika. Men behandling av bakterielle infeksjoner blir stadig mer utfordrende på grunn av økende antibiotikaresistens både her i Norge og internasjonalt. Verdens helseorganisasjon (WHO) anslår at innen 2050 vil 10 millioner liv gå tapt årlig på grunn av antibiotikaresistens (1). Selv om antibiotikaresistens er en av de største truslene mot folkehelsen, utvikles det få nye antibiotika. For å sikre enkle behandlingsalternativer for fremtidens infeksjoner må vi investere i forskning og utvikling av flere antibiotika.

To nye antibiotika-kandidater har en synergistisk effekt mot MRSA

I 2020 publiserte vi en studie om de bakteriedrepende egenskapene til en gruppe peptider som hindrer DNA-replikasjon ved å binde til det bakterielle

proteinet β -clamp (2). Den mest lovende kandidaten i denne gruppen er peptidet BTP-001 (3). Samtidig drev forskerne ved Institutt for kjemi et arbeid med å utvikle nye antibiotika-kandidater basert på en kjent DNA-synteseinhibitor. Ett av disse stoffene er JK-274, en brominert pyrrolopyrimidin. På laboratoriet så vi at BTP-001 og JK-274 effektivt dreper MRSA i kombinasjon, ved lavere konsentrasjoner enn ved enkeltbehandling, en såkalt synergieffekt (4). Konsentrasjonen av JK-274 som er nødvendig for å drepe MRSA reduseres med en faktor på åtte når den kombineres med BTP-001. At man får god effekt ved lavere konsentrasjoner av BTP-001 og JK-274 kan redusere potensielle bivirkninger i humane celler. Å angripe bakteriene på to ulike måter på samme tid, reduserer også sannsynligheten for resistensutvikling.

Kostbart og tidkrevende

Bestemmelse av virkningsmekanismene er kritisk når en antibiotika-kandidat vurderes for videre utvikling. Vanligvis tar det rundt ti år og over ti milliarder kroner å utvikle et nytt legemiddel. Derfor er det viktig å kun investere i de mest lovende kandidatene. En grundig forståelse av hvordan et stoff forårsaker bakteriedød kan gi verdifull innsikt om mulige resistensmekanismer og sekundære effekter.

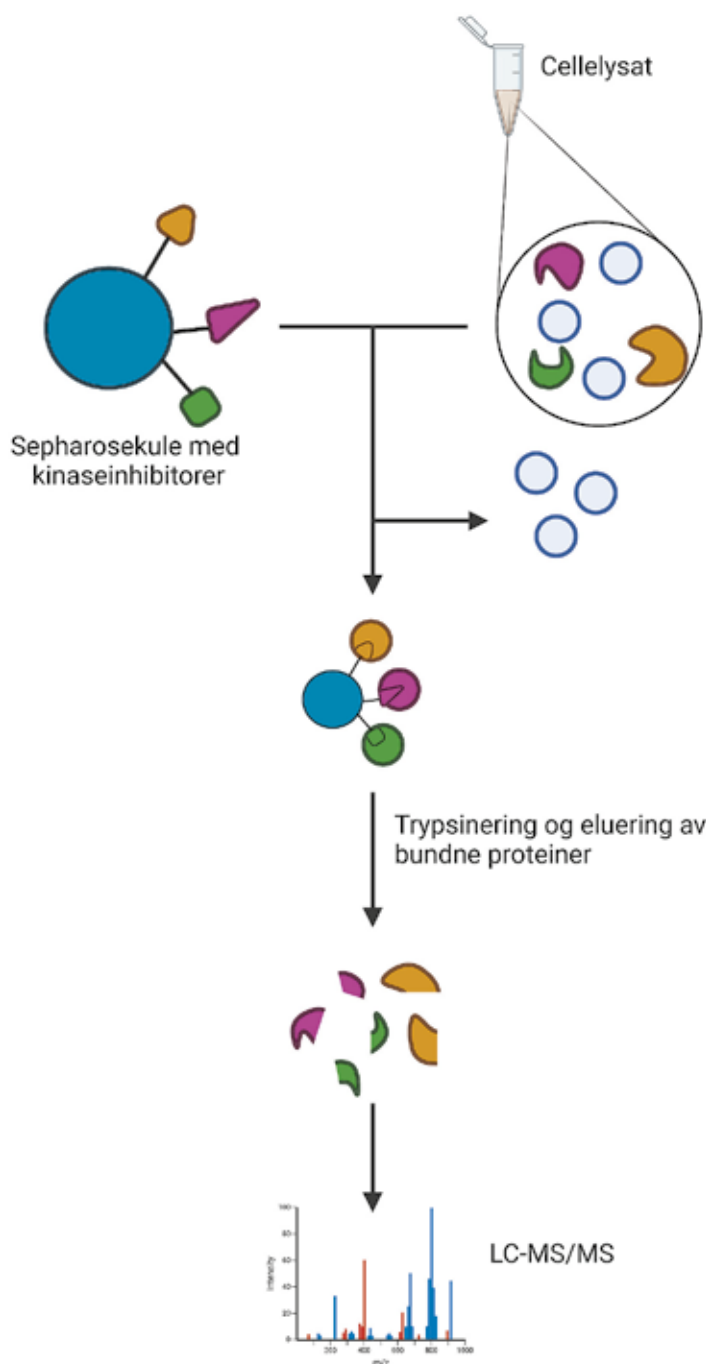
Metode og sentrale funn

For å studere den bakteriedrepende effekten av BTP-001 og JK-274 i kombinasjon, optimaliserte vi en metode

som tidligere er brukt for å studere signalsystemer i menneskeceller. Metoden kalles for «multiplexed kinase inhibitor bead assay» (MIB) og tar i bruk kinaseinhibitorer koblet til sepharosekuler for å fange aktiverte signalproteiner, som kinaser, og relaterte proteiner. Kinaseinhibitorene binder til ATP/GTP-bindingssettet bare i aktiverte kinaser/signalproteiner eller proteiner i kompleks med disse (Figur 1). Deretter blir dette sub-proteomet analysert med massespektrometri som identifiserer hvilke proteiner som er dratt ned.

Ved å se på aktiverte signalproteiner og sammenligne med ubehandlet kontroll, får vi innsikt i hvilke prosesser som aktiveres eller deaktiveres i respons til behandlingen. For eksempel, ved behandling av gule stafylokokker med JK-274, detekterte vi lavere nivåer av aktiverte proteiner i sitronsyresyklusen sammenlignet med en ubehandlet kontroll, en indikasjon på at JK-274 hindrer energiomsetningen i bakteriecellen.

Strukturelle forskjeller i ATP/GTP-bindingssettet mellom proteiner i menneskeceller og bakterieceller fører ofte til ulik bindingsaffinitet til kinaseinhibitorer. Når vi brukte de samme kinaseinhibitorene til MIB som ble brukt til menneskeceller, detekterte vi svært få bakterielle signalproteiner. For å øke antall detekterte bakterielle proteiner, og dermed øke vår innsikt i bakterienes signalsystemer, testet vi fem nye kinaseinhibitorer syntetisert av våre samarbeidspartner på Institutt for kjemi og Institutt for materialteknologi



FIGUR 1: Multiplexed kinase inhibitor bead assay (MIB) Cellelysat blandes med sepharosekuler koblet til tre ulike kinaseinhibitorer i en kolonne. Kinaseinhibitorerne binder seg til ATP-/GTP-bindingssetet til kinaser og fanger dermed opp aktiverte kinaser og relaterte proteiner. Ubundet cellelysat blir vasket bort fra kolonnen før bundne proteiner gjennomgår trypsinering, et trinn hvor de enzymatisk klippes i mindre fragmenter kalt peptider. Peptidene elueres fra kolonnen og blir analysert med massespektrometri, som identifiserer hvilke proteiner som er dratt ned.

ved NTNU. Ved å ta i bruk to av disse kinaseinhibitorer i kombinasjon med en kommersiell kinaseinhibitor, klarte vi å øke affiniteten for bakterielle proteiner og dra ned 1568 proteiner fra gule stafy-

lokokker (1).

Den nye MIB-metoden viser at den gode kombinasjonseffekten skyldes at BTP-001 og JK-274 til sammen aktive- rer stressmekanismer i bakteriene som

de hver for seg ikke aktiverer. Dette økte stresset fører til bakteriedød. De gode kombinasjonsresponsene i bakteriene tyder på at disse to stoffene kan være en lovende antibiotikakombinasjon, som burde studeres videre. Det er en lang vei fra laboratorieforsøk til BTP-001 og JK-274 kan brukes for å behandle infeksjoner i mennesker, men med bedre innsikt i virkningsmekanismene kan man bedre forutse potensielle bivirkninger i humane celler. Derfor er denne studien og metodeutviklingen et viktig skritt i kampen mot økende antibiotikaresistens. ■

Referanser

1. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2014.
2. Nedal A, Ræder SB, Dalhus B, Helgesen E, Forstrøm RJ, Lindland K, et al. Peptides containing the PCNA interacting motif APIM bind to the β -clamp and inhibit bacterial growth and mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(10):5540-54.
3. Nepal A, Ræder SB, Søgaard CK, Haugan MS, Otterlei M. Broad-spectrum antibacterial peptide kills extracellular and intracellular bacteria without affecting epithelialization. *Front Microbiol.* 2021;12:764451.
4. Olsen CE, Blindheim FH, Søgaard CK, Røst LM, Singleton AH, Bergum OET, et al. Halogenated pyrrolopyrimidines with low MIC on *Staphylococcus aureus* and synergistic effects with an antimicrobial peptide. *Antibiotics.* 2022;11(8):984.
5. Singleton AH, Bergum OET, Søgaard CK, Røst LM, Olsen CE, Blindheim FH, et al. Activation of multiple stress responses in *Staphylococcus aureus* substantially lowers the minimal inhibitory concentration when combining two novel antibiotic drug candidates. *Front Microbiol.* 2023;14:1260120.

Om artikkelen

Studien ble utført av ph.d.-stipendiatene Amanda Holstad Singleton og Olaug Elisabeth Torheim Bergum, i samarbeid med flere fra Institutt for bioteknologi og matvitenskap, Institutt for kjemi og Institutt for materialteknologi, og ledet av professor Marit Otterlei ved NTNU. Den er publisert i tidsskriftet *Frontiers in Microbiology* (5). Studien er en del av forskningsprosjektet TAMiR som er finansiert av Trond Mohn-stiftelsen (<https://www.ntnu.edu/ikom/tamir>).