



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery of antibiotics and their targets in multidrug-resistant bacteria

Bakker, A.T.

Citation

Bakker, A. T. (2022, December 7). *Discovery of antibiotics and their targets in multidrug-resistant bacteria*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3492748>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3492748>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

De ontdekking van antibiotica en hun doelwitten in bacteriën met resistentie tegen meerdere geneesmiddelen

Het antibiotica probleem.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is een reactie op een van de grootste problemen van de moderne tijd: antibiotica resistentie. Tot voor kort waren bacteriële infecties een van de grootste oorzaken van sterfte en verloren levensjaren onder de mensheid. De ontdekking en ontwikkeling van antibiotica in de vroege 20^e eeuw heeft hier op ongekende snelheid verandering in gebracht. Infecties die vroeger fataal zouden zijn konden plotseling makkelijk behandeld worden. Dit is dan ook ongetwijfeld een van de grootste redenen geweest dat mensen gemiddeld 30 jaar ouder werden aan het eind van de 20^e eeuw ten opzichte van het begin van de 20^e eeuw.

Er werd echter al snel waargenomen dat deze antibiotica na verloop van tijd, en dankzij overmatig gebruik, hun effectiviteit verloren. Het welbekende penicilline werd bijvoorbeeld uitvoerig gebruikt als essentieel hulpmiddel gedurende de Tweede Wereldoorlog, waarna er in de jaren 50 een ernstig maatschappelijk probleem was betreft de sterk verminderde effectiviteit van dit middel. Dit bleek te komen door de resistentie die bacteriën op rap tempo konden opbouwen tegen dit middel, waarbij de fitste bacteriën de opgebouwde resistentie konden doorgeven aan de volgende generaties. Hierop reageerde de mensheid door kleine chemische aanpassingen te maken aan het penicilline molecuul, waardoor het zijn activiteit terugwon. In vrijwel elk geval, echter, kon de bacterie hetzelfde trucje herhalen. Voor elk antibioticum wat op de markt is gebracht was resistentie binnen korte tijd geobserveerd. Dit heeft er grotendeels tot geleid dat er constant verbeteringen moesten worden gemaakt op de bestaande antibiotica, waarna de bacterie weer nieuwe resistentie kon ontwikkelen.

Hoewel dit in het verleden werkte, verloor deze strategie om tot nieuwe antibiotica te komen zijn effectiviteit in de laatste decennia. Veel van de natuurlijke antibiotica zijn inmiddels uitgeput, en het verbeteren van bestaande antibiotica wordt steeds lastiger. Dit is goed te zien in de afnemende hoeveelheid nieuwe antibiotica, en aan groeiende sterftecijfers. Meer dan 1.2 miljoen mensen wereldwijd stierven als gevolg van antibiotica resistentie in 2019, en voorspeld wordt dat dit kan groeien tot 10 miljoen jaarlijkse doden in 2050. Er is een selectie van bacteriën die hoofdschuldig zijn aan dit probleem, waaronder meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en resistente vormen van *Escherichia coli*. En om infecties van deze bacteriën tegen te gaan zijn dan ook dringend nieuwe strategieën vereist.

In Hoofdstuk 2 wordt een verzameling chemische stoffen getest om te kijken of ze bacteriële groei kunnen stoppen van deze bacteriën. Deze verzameling is opgebouwd uit chemische stoffen die in de afgelopen 10 jaar in onze onderzoeksgroep zijn gemaakt en gebruikt voor projecten die onder meer verschillende soorten kanker, en het endocannabinoïde systeem bestudeerden. Het doel hierbij was om een selectie unieke stoffen te hebben die nog niet eerder getest zijn op antibacteriële activiteit. Deze stoffen zijn structureel niet gerelateerd aan bestaande antibiotica, en onze hypothese was dan ook dat wanneer een van deze stoffen antibacteriële activiteit vertoonde, deze dan ook via een ander mechanisme zou werken dan bestaande antibiotica. Op deze manier zou je een nieuwe klasse wapens hebben om bacteriën te bestrijden, in plaats van een kleine modificatie op een bestaand wapen.

Uit deze test volgden twee duidelijke 'hit' moleculen: één die het meest potent was tegen MRSA, en één die het meest potent was tegen *E. coli*.

Nieuwe antibiotica tegen MRSA-infecties.

In Hoofdstuk 3 wordt beschreven hoe de MRSA-hit potenter kon worden gemaakt middels structurele wijzigingen. Eerst werd gekeken welke delen van het molecuul essentieel zijn voor de activiteit. Dit werd gedaan door een serie moleculen te ontwerpen, deze te synthetiseren, en uiteindelijk deze te testen voor antibacteriële activiteit. Er werd dat de originele structuur versimpeld kon worden door een methylcarbamaat groep te vervangen door een amide, zonder veel activiteit te verliezen. Op deze versimpelde structuur konden vervolgens makkelijker uitbreidingen worden gebouwd. In dit hoofdstuk is uiteindelijk de synthese en antibacteriële activiteit van meer dan 60 unieke eindverbindingen beschreven, waarbij systematisch bepaalde kanten van het molecuul zijn gewijzigd om te kijken wat voor invloed dat had op antibacteriële activiteit.

Uiteindelijk werd stof **3** (ook bekend als LM027) gevonden als meest potente stof tegen MRSA, met een 8 maal zo hoge potentie als de originele hit. Stof **3** werd daarna getest op cytotoxiciteit voor menselijke cellen, en gevonden werd dat deze een acceptabel toxiciteitsprofiel had. Daarnaast bleek stof **3** ook net zo potent te werken tegen een grote variatie resistente vormen van *S. aureus*, waaronder ook zwaar resistente klinische vormen.

In Hoofdstuk 4 werd vervolgens onderzocht wat het werkingsmechanisme was van stof **3** en verwante stoffen. Het interessantste aan deze reeks stoffen was de oxadiazolongroep die bekend staat als een covalent bindende *warhead*. Geïnspireerd hierdoor werd een chemische probe gebaseerd op de structuur van stof **3** gebruikt, die een covalente binding kan vormen met interacterende eiwitten, en daarna kan worden uitgelezen middels analysemethoden. Door middel van massaspectrometrie-gebaseerde chemische proteomics, werden de interactie partners van stof **3** geïdentificeerd, waarvan het grootste deel van deze eiwitten cysteine en serine proteases zijn.

Hierna werd gekeken of MRSA resistent kon worden gemaakt tegen stof **3**. Na een maand dagelijks deze bacteriën onder druk te zetten met stof **3** lukte dit. Van deze resistente vorm van MRSA werd vervolgens zowel het eiwitprofiel als de eiwit activiteit vergeleken met het wild type, en hieruit bleek dat de activiteit van het eiwit AdhE was afgenomen tot 20% van het originele niveau. Verder waren er kleine maar significante stijgingen in de expressie niveaus van eiwitten FphE, AdhE en FabH.

Om erachter te komen welke doeleiwitten van stof **3** een rol speelde in het antibiotische effect van de stof, werd het eiwitinteractie patroon van stof **3** vergeleken met dat van zowel soortgelijke antibacterieel actieve als inactieve stoffen. Een hoofdcomponentenanalyse van de eiwitinteractie patronen suggereerde dat twee eiwitten, AdhE en FphC, voornamelijk door de actieve stoffen werden gehinibeerd. Interessant genoeg werd inhibitie van het essentiële eiwit FabH ook waargenomen bij de inactieve stoffen. Aansluitend werd er gevonden dat de inactieve stoffen potent werden wanneer ze op MRSA soorten werden getest die de eiwitten AdhE of FphC misten. Deze data suggereert dat het werkingsmechanisme van stof **3** te danken is aan gezamenlijke inhibitie van AdhE, FphC, en FabH, waarbij de rol van andere eiwitten niet kan worden uitgesloten.

Nieuwe antibiotica tegen Gram-negatieve infecties.

In Hoofdstuk 5 werd gevonden dat isoquinoline sulfonamides activiteit vertonen tegen Gram-negatieve bacteriën, voornamelijk *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Na het testen van een uitgebreidere reeks aan isoquinoline sulfonamides die in context van een ander project waren gemaakt, werd duidelijk dat de oorspronkelijke hit hoogstwaarschijnlijk actief was door zijn unieke lengte van het middenstuk. Hierna werd een grote variatie moleculen gemaakt op deze hit, waarbij elk gedeelte van het molecuul gewijzigd werd behalve de lengte van het middenstuk. Gevonden werd dat er erg weinig ruimte was voor verandering, aangezien een groot deel van de veranderingen zorgde voor volledig verlies van antibacteriële activiteit. Conformatie restrictie van het middenstuk werd geprobeerd, wat leidde tot een serie pyrrolidine bevattende diastereoisomeren, waarvan de *cis-2R-5S* conformatie als enige potenter was dan de originele hit. Dit leidde vervolgens tot het ontwerp van LEI-800, en het gerelateerde inactieve isomeer LEI-801.

Hoofdstuk 6 beschrijft de verheldering van het werkingsmechanisme van LEI-800 in *E. coli*. Middels *bacterial cytological profiling* in combinatie met whole genome sequencing op gegenereerde isoquinoline sulfonamide resistente *E. coli* mutanten werd gevonden dat het specifieke doelwit van LEI-800 dat voor het antibacteriële effect zorgt het DNA gyrase complex is. DNA gyrase is een bacterieel topoisomerase eiwit dat verantwoordelijk is voor negatieve supercoiling in bacteriën, geen directe homologe heeft in menselijke cellen, en het doelwit is van meerdere klassen gyrase inhibitors waaronder de fluoroquinolonen. Biochemische assays lieten vervolgens zien dat LEI-800 het supercoiling proces van DNA gyrase 26x beter inhibeert dan ciprofloxacin (CIP), een veelgebruikt fluoroquinolone antibioticum waarvoor resistentie uitvoerig is waargenomen in klinische omgevingen. Ondanks de hogere supercoiling inhibitie van LEI-800 was de antibacteriële activiteit aanzienlijk minder dan dat van CIP. Dit komt gedeeltelijk door de lage cel permeabiliteit van LEI-800: genetische en farmacologische membraanontregeling leidden beiden tot een tien keer hogere potentie van LEI-800 in *E. coli*. Structurele studies, gedaan via cryo-elektronen microscopie lieten zien dat LEI-800 op een unieke manier het DNA gyrase complex bindt, op een plek afgelegen van tot heden bekende gyrase inhibitors.

Tot slot

De resultaten besproken in dit proefschrift betreffen uitbreidingen op het bestaande antibiotisch arsenaal. Er zijn nog veel obstakels om te overkomen zullen moleculen gebaseerd op deze chemotypes klinisch succes willen behalen. Waar de focus in dit proefschrift voornamelijk lag op kwaliteiten als antibacteriële activiteit tegen klinisch relevante pathogenen, en een acceptabel menselijk toxiciteitsprofiel, zijn er nog veel andere eigenschappen waarop geoptimaliseerd dient te worden. Deze studies zijn momenteel in gang gezet. Maar ongeacht toekomstig klinisch succes heeft dit onderzoek de kennis verbreed in het veld van antibiotica onderzoek. Met het nieuwe chemisch gereedschap in dit proefschrift kunnen pathogene bacteriën tezamen met de blootgelegde doelwitten in de toekomst beter bestudeerd worden.