

Az antimikrobiális peptidekkel szemben
kialakuló rezisztencia rendszer szintű
vizsgálata

PhD értekezés

Daruka Lejla

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai
Intézet

SZTE-TTIK

2023.

Szeged

Bevezetés

Az antibiotikum rezisztencia korunk egyik legnagyobb egészségügyi kihívása. Előrejelzések szerint 2050-re az antibiotikum rezisztens baktériumok annyira elterjednek, hogy vezető halálok lesz egy eddig kezelhető bakteriális fertőzés. A kialakulóban levő egészségügyi helyzet nem csak az egészségügyi ellátó rendszernek, de a kutatóknak is komoly kihívást jelent. A már kifejlesztett és eddig megbízhatóan használt antibiotikumok egyre inkább hatástalanok, ezért folyamatosan újabb és újabb szereket kell kifejleszteni. Ez a kutatási terület viszont az utóbbi ötven évben jelentősen lelassult.

Az új, kis molekulájú antibiotikumok mellett lehetséges megoldás az olyan megközelítések fejlesztése, melyek egyelőre a klasszikus antibiotikum kezelések alternatívái. Ilyen megközelítés az antimikrobiális peptidok (röviden AMP-k). Az AMP-k rezisztencia hajlama vitatott a szakirodalomban. Hatásmechanizmusokat figyelembe véve a rezisztencia ritkábban alakul ki velük szemben, ellenben már több tanulmányban kimutatták, hogy a baktériumok egyes AMP-kkel szemben képesek ellenállóvá válni.

Az AMP-k a természetben nagyon elterjedt molekulák, az élőlények minden szintjén megtalálhatóak. Az AMP-k ölü hatásukat több módon is kifejtethetik. Képesek a bakteriális membránba inszertálódni és ott pórusokat formálni, illetve több intracelluláris célponthoz képesek kötődni és megakadályozni azok működését. Számos esetben ilyen célpontokból több is található egy baktérium sejt esetében. Az AMP-k főleg kationos természetűek, így elektrosztatikus vonzóerővel tudnak kötődni a negatívan töltött bakteriális membránhoz, míg a humán semleges töltésű membrán ezt nem teszi lehetővé, így biztosítva a szelektív hatást.

A jelenlegi egészségügyi válságban olyan szereket kell fejleszteni, melyekre a baktériumok nem tudnak rezisztenciát fejleszteni. Mivel az AMP-k a humán immunrendszer szerves részét képezik, az AMP-knek ellenálló baktériumok komoly veszélyt jelenthetnek, ezért a rezisztencia perdikciója elengedhetetlen.

Az AMP-k pozitív tulajdonságait kihasználva és a korai rezisztencia kísérletekkel olyan területet nyithatunk meg az antibakteriális szerek kutatásában, mely hosszútávon gyümölcsöző lehet.

Célkitűzés

Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) potenciális megoldásai az antibiotikum rezisztencia krízisnek, viszont ezek a molekulák csak akkor jelenthetnek valódi megoldást, ha hosszú távon, rezisztencia kialakulása nélkül alkalmazhatóak. A szakirodalomban jelenleg vitatott, hogy az AMP-ekkel szemben milyen mértékű rezisztencia alakul ki antibiotikumokkal összehasonlítva. Emellett további kérdés, hogy a rezisztencia mechanizmusai AMP specifikusak-e vagy növelik az ellenállóképességet számos AMP-vel szemben.

Doktori munkám során ezért célul tűztem ki, hogy nagy átteresztőképességű módszerekkel vizsgáljam az AMP-ekkel szemben kialakuló rezisztenciát, és azt konvencionális antibiotikumokkal kialakuló rezisztenciával hasonlítsam össze. Munkám során az alábbi kísérletek elvégzését tűztem ki célul:

- Rendszer szinten vizsgálni a *de novo* mutációk hatását az AMP rezisztenciára, antibiotikumokkal összehasonlítva. Ehhez egy hosszútávú laboratóriumi evolúciós kísérletet végzünk el 14 AMP-vel és 12 konvencionális antibiotikummal. Vizsgálataink a laboratóriumi *E.coli* törzsek mellett kiterjedtek klinikailag releváns patogén baktérium fajokra is.
- Rendszer szinten vizsgálni a horizontális géntranszfer, illetve a génamplifikáció hatását az AMP-ekkel szemben kialakuló rezisztenciára.
- A kialakult rezisztencia folyamatok általánosságának vizsgálata, az AMP keresztrezisztencia hálózat feltérképezése.
- A kialakult rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálata.

Alkalmazott módszerek

Kísérleteim során elsődlegesen *Escherichia coli* K-12 BW25113 törzset használtunk, de vizsgáltunk klinikailag releváns patogén kórokozókat is, mint *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (*S. enterica* LT2), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 100301 és *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978.

Ahhoz, hogy átfogó képet kapjunk az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztenciáról, 14 AMP-vel végeztük el a kísérleteinket és a kapott eredményeket az általunk használt 12 antibiotikumnál megfigyelt eredményekkel hasonlítottuk össze.

A használt törzsekkel és antibakteriális szerekkel az alábbi kísérleteket végeztük el:

Laboratóriumi evolúciós kísérlet:

A kísérletben a baktériumot egy általunk használt szer jelenlétében növesztjük úgy, hogy az átoltások során folyamatosan növeljük a adott szer koncentrációját. Ezzel a kísérlettel azt tudjuk vizsgálni, hogy a baktériumok képesek e adaptálódni egy antibakteriális szerhez, és hogy ezt mekkora mértékig képesek fokozni. Az általunk használt kísérleti módszerrel kiterjesztjük a baktériumok ellenállást az adott szerrel szemben, úgy, hogy jelentős szelektív nyomást gyakorolunk a baktériumokra. A kísérlet végén megmértük az adaptált vonalak minimális gátló koncentrációját (MIC), amit a kiindulási törzshöz hasonlítottunk, így megkaptuk a relatív MIC változást. A rezisztens baktériumok teljes genomját megszekvenáltuk, hogy megismerjük a rezisztenciát biztosító mutációkat.

Funkcionális metagenomika: A horizontális géntranszfer a természetben gyakran bekövetkezik, és lehetővé teszi az egyazon fajhoz tartozó baktériumok közötti és az interszifikus genetikai információ átvitelt, amellyel az akceptor sejtek különböző rezisztenciát biztosító folyamatokat szerezhetnek. A horizontálisan terjedő rezisztens karakterizálásához talaj mikrobiomból készítettünk funkcionális metagenomika könyvtárat, amellyel 4 antibiotikumot és 4 AMP-t teszteltünk. A funkcionális szelekciót agar lemezekon hajtottuk végre. A szelektív agar lemezekről összegyűjtöttük a rezisztens kolóniákat és Illumina szekvenálással meghatároztuk a rezisztenciát biztosító ORF-eket.

Génamplifikáció hatásának vizsgálata:

A génamplifikáció hatásának vizsgálatához az ASKA könyvtárat használtuk, ami tartalmazza az összes *E. coli* ORF-t egy expressziós vektorba klónozva (pCA24N). Kontroll törzsnek

úgynevezett üres, ORF-t nem tartalmazó ASKA plazmiddal transzformált *E.coli* törzset használtunk. A méréseket megelőzően, az egyedi ASKA plazmidokat egybegyűjtöttük és *E. coli* K-12 BW25113 törzsbe transzformáltuk, amellyel létrehoztuk az ASKA könyvtárat. Az ASKA könyvtárral ezután MIC mérésekkel határoztuk meg a génamplifikáció hatását az egyes AMP-kkel szemben.

Felületi töltöttség meghatározása:

A baktériumok felületi töltöttségében bekövetkezett változások vizsgálatához egy fluoreszeins-izotiocianát poly-L-lizin (FITC-PLL) kötődési vizsgálatot végeztünk el. FITC-PLL egy polikationos molekula, amit széles körben használnak a kationos AMP-k és töltött bakteriális membrán közötti interakciók vizsgálatára. A FITC-PLL kötődik a membrán külső felszínén található negatív töltésekhez, ezáltal a felülúszóban maradt FITC-PLL mennyiségéből következtetni lehet a membrán töltöttségi szintjéhez. A kötődött FITC-PLL mennyiségét a kontroll és a nem kötött FITC-PLL mennyisége közötti különbségből következtettünk.

Eredmények

- A laboratóriumi evolúciós kísérletek alapján kimutattuk, hogy az AMP-kkel szemben általánosan kisebb mértékű rezisztencia alakul ki, mint antibiotikumokkal szemben. Az általunk vizsgált 14 AMP közül hattal szemben nem, vagy csak nagyon kismértékű rezisztencia alakult ki, mely az egyik legjelentősebb megfigyelésünk. Ezért ezek, a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k alkalmasak arra, hogy a rezisztencia mentes, hosszú távon hatékony antibiotikum fejlesztések középpontjába helyezték. Az általunk vizsgált AMP-k közül azonosítottunk olyanokat, amelyekkel szemben nagymértékű, az antibiotikumokkal összevethető, rezisztencia alakult ki. A legmagasabb relatív MIC értékeket a PXB-vel szemben figyeltük meg, amely felépítését tekintve rokona a kolisztin antibiotikumnak. A kolisztin egy úgynevezett “last-resort drug”, vagyis azokban az esetekben alkalmazzák, mikor már más antibiotikum nem hatékony a fertőzést okozó baktérium multidrog rezisztenciája miatt. Fontos megjegyezni, hogy az elmúlt években kifejlesztett új antibiotikumok között gyakoriak a polimixin származékok. Így a PXB-vel szembeni nagymértékű rezisztencia komoly aggodalomra ad okot.
- Az AMP-kkel szemben a rezisztencia kialakulása, az antibiotikumokkal összehasonlítva, további mechanizmusok által is korlátozott. A horizontális géntranszfer folyamatának vizsgálatához funkcionális metagenomikai módszereket alkalmaztunk. A vizsgált könyvtárat talajmintából nyert genetikai anyagból állítottuk össze. Az általunk vizsgált talajminta nem tartalmazott rezisztenciát biztosító kontigokat a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k esetében.
- A génamplifikáció hatásának vizsgálatára egy túltermeltető plazmidot alkalmaztunk, amely modellezi az egyes *E.coli* ORF-ek amplifikációját. A túltermelő plazmidokat egy könyvtárba gyűjtöttük, majd egy eredetileg érzékeny *E.coli* baktériumba transzformáltuk, és mértük a fellépő MIC változást. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy antibiotikumokkal összehasonlítva, a génamplifikáció nem biztosít rezisztenciát az általunk vizsgált AMP-kkel szemben.

- Az általunk megfigyelt rezisztencia folyamatok nem általánosak minden AMP-re. Mivel az AMP-knek hasonló a hatásmechanizmusuk, ezért komoly aggodalomra adhat okot, hogy egy kialakult rezisztencia folyamat keresztrezisztenciát okoz a humán immunrendszerben megtalálható AMP-kre is. Kimutattuk, hogy a keresztrezisztencia ritka.
- A rezisztens sejtvonalak teljes genom szekvenálása során megfigyeltük, hogy a rezisztenciát biztosító folyamatok jelentős része a bakteriális külső membrán felépítését befolyásolja. Ezek a folyamatok hatással vannak a külső felszín töltésére. Az AMP-k szelektív baktériumölő képessége az AMP pozitív töltése és a bakteriális membrán negatív töltése közötti elektrosztatikus kölcsönhatáson alapszik. Kimutattuk, hogy a rezisztenciával rendelkező sejtvonalak jelentős részének kevésbé negatív lett a felszíne a mutációk miatt, ami így biztosította a rezisztenciát.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy egyes AMP-kkel szemben laboratóriumi körülmények között nem vagy csak nagyon kismértékű rezisztencia alakul ki. Ezek a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k a jövőbeli antibiotikum fejlesztési folyamatokban jó kiinduló pontok lehetnek olyan gyógyszerek fejlesztésére, melyeket hosszú távon alkalmazhatunk a klinikumban a patogén baktériumokkal szembeni harcban.

Summary

- Laboratory evolutionary experiments have shown that AMPs generally develop less resistance than antibiotics. Six out of the 14 AMPs we studied showed no or very low levels of resistance, one of our most significant observations. Therefore, these AMPs, which are less susceptible to resistance, are suitable to be the focus of resistance-free, long-term effective antibiotic development. Among the AMPs we have investigated, we have identified AMPs with high levels of antibiotic-comparable resistance. The highest relative MIC values were observed against PXB, which is structurally related to the antibiotic cholistin. Cholistin is a so-called "last-resort drug", i.e. it is used in cases where other antibiotics are no longer effective due to multidrug resistance of the infecting bacterium. It is important to note that polymixin derivatives are common among the new antibiotics developed in recent years. Thus, high levels of resistance to PXB are a serious concern.
- The development of resistance to AMPs, compared to antibiotics, is limited by additional mechanisms. Functional metagenomics methods were used to investigate the process of horizontal gene transfer. The library under study was constructed from genetic material obtained from soil samples. The soil sample we studied did not contain resistance contigs for AMPs less susceptible to resistance.
- To investigate the effect of gene amplification, we used an overexpression plasmid that mimics the amplification of specific E.coli ORFs. The overexpressing plasmids were collected in a library, transformed into an initially sensitive E.coli bacterium and the MIC change that occurs was measured. In our experiments we showed that, compared to antibiotics, gene amplification does not confer resistance to the AMPs we tested.
- The resistance processes we observed are not general for all AMPs. Since AMPs have similar mechanisms of action, it may be of serious concern that an established resistance process may also cause cross-resistance to AMPs in the human immune system. Cross-resistance has been shown to be rare.
- Whole-genome sequencing of resistant cell lines has shown that a significant proportion of the processes conferring resistance affect the architecture of the bacterial outer membrane. These processes affect the charge on the outer surface. The selective bactericidal ability of AMPs is based on the electrostatic interaction between the positive charge of the AMP and the

negative charge of the bacterial membrane. We have shown that a significant proportion of the cell lines with resistance had a less negative surface charge due to mutations, thus conferring resistance.

In summary, we have shown that no or very little resistance to some AMPs develops under laboratory conditions. These AMPs, which are less susceptible to resistance, could be a good starting point for future antibiotic development processes to develop drugs that can be used in the clinic in the long term to fight pathogenic bacteria.

Publikációk

A doktori eljárás alapját képező közlemény:

R. Spohn*, **L. Daruka***, V. Lázár, A. Martins, F. Vidovics, G. Grézal, O. Méhi, B. Kintsés, M. Számel, P. K. Jangir, B. Csörgő, Á. Györkei, Z. Bódi, A. Faragó, L. Bodai, I. Földesi, D. Kata, G. Maróti, B. Pap, R. Wirth, B. Papp, C. Pál, Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* **10**, 4538 (2019). *megosztott első szerző

IF: 12.121

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

R. Spohn, **L. Daruka**, V. Lázár, A. Martins, F. Vidovics, G. Grézal, O. Méhi, B. Kintsés, M. Számel, P. K. Jangir, B. Csörgő, Á. Györkei, Z. Bódi, A. Faragó, L. Bodai, I. Földesi, D. Kata, G. Maróti, B. Pap, R. Wirth, B. Papp, C. Pál, Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* **10**, 4538 (2019).

IF: 12.121

V. Lázár, A. Martins, R. Spohn, **L. Daruka**, G. Grézal, G. Fekete, M. Számel, P. K. Jangir, B. Kintsés, B. Csörgő, Á. Nyerges, Á. Györkei, A. Kincses, A. Dér, F. R. Walter, M. A. Deli, E. Urbán, Z. Hegedűs, G. Olajos, O. Méhi, B. Bálint, I. Nagy, T. A. Martinek, B. Papp, C. Pál, Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nat Microbiol.* **3**, 718–731 (2018).

IF: 26.109

Á. Györkei, **L. Daruka**, D. Balogh, E. Ószi, Z. Magyar, B. Szappanos, G. Fekete, M. Fuxreiter, P. Horváth, C. Pál, B. Kintsés, B. Papp, Proteome-wide landscape of solubility limits in a bacterial cell. *Sci Rep.* **12**, 1–13 (2022).

IF: 4.996

K. N. Bhaumik, A. Hetényi, G. Olajos, A. Martins, R. Spohn, L. Németh, B. Jojart, P. Szili, A. Dunai, P. K. Jangir, **L. Daruka**, I. Földesi, D. Kata, C. Pál, T. A. Martinek, Rationally designed foldameric adjuvants enhance antibiotic efficacy via promoting membrane hyperpolarization. *Mol Syst Des Eng.* **7**, 21–33 (2022).

IF: 4.92

M. Durcik, Á. Nyerges, Ž. Skok, D. G. Skledar, J. Trontelj, N. Zidar, J. Ilaš, A. Zega, C. D. Cruz, P. Tammela, M. Welin, Y. R. Kimbung, D. Focht, O. Benek, T. Révész, G. Draskovits, P. É. Szili, **L. Daruka**, C. Pál, D. Kikelj, L. P. Mašič, T. Tomašič, New dual ATP-competitive inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV active against ESKAPE pathogens. *Eur J Med Chem.* **213**, 113200 (2021).

IF: 6.82

A. Nyerges, T. Tomašič, M. Durcik, T. Revesz, P. Szili, G. Draskovits, F. Bogar, Ž. Skok, N. Zidar, J. Ilaš, A. Zega, D. Kikelj, **L. Daruka**, B. Kintsés, B. Vasarhelyi, I. Földesi, D. Kata, M. Welin, R. Kimbung, D. Focht, L. P. Mašič, C. Pal, Rational design of balanced dual-targeting antibiotics with limited resistance. *PLOS Biol.* **18**, e3000819 (2020).

IF: 8.029

B. Kintsés, P. K. Jangir, G. Fekete, M. Számel, O. Méhi, R. Spohn, **L. Daruka**, A. Martins, A. Hosseinnia, A. Gagarinova, S. Kim, S. Phanse, B. Csörgő, Á. Györkei, E. Ari, V. Lázár, I. Nagy, M. Babu, C. Pál, B. Papp, Chemical-genetic profiling reveals limited cross-resistance between antimicrobial peptides with different modes of action. *Nat Commun.* **10** (2019), doi:10.1038/s41467-019-13618-z.

IF: 12.121

P. Szili, G. Draskovits, T. Révész, F. Bogár, D. Balogh, T. Martinek, **L. Daruka**, R. Spohn, B. M. Vásárhelyi, M. Czikkely, B. Kintsés, G. Grézal, G. Ferenc, C. Pál, Á. Nyerges, Rapid Evolution of Reduced Susceptibility against a Balanced Dual-Targeting Antibiotic through Stepping-Stone Mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **63**, e00207-19 (2019).

IF: 4.904

A. Bocsik, I. Gróf, L. Kiss, F. Ötvös, O. Zsíros, **L. Daruka**, L. Fülöp, M. Vastag, Á. Kittel, N. Imre, T. Martinek, C. Pál, P. Szabó-Révész, M. A. Deli, Dual Action of the PN159/KLAL/MAP Peptide: Increase of Drug Penetration across Caco-2 Intestinal Barrier Model by Modulation of Tight Junctions and Plasma Membrane Permeability. *Pharmaceutics.* **11**, 73 (2019).

IF: 4.65

R. Szabó, R. Ménesi, A. H. Molnár, Z. Szalai, **L. Daruka**, G. Tóth, J. Gardi, M. Gálfi, D. Börzsei, K. Kupai, A. Juhász, M. Radács, F. László, C. Varga, A. Pósa, New Metabolic Influencer on Oxytocin Release: The Ghrelin. *Molecules.* **24**, 735 (2019).

IF: 3.29

E. Natan, T. Endoh, L. Haim-Vilmovsky, T. Flock, G. Chalancon, J. T. S. Hopper, B. Kintsés, P. Horvath, **L. Daruka**, G. Fekete, C. Pál, B. Papp, E. Oszi, Z. Magyar, J. A. Marsh, A. H. Elcock, M. M. Babu, C. V. Robinson, N. Sugimoto, S. A. Teichmann, Cotranslational protein assembly imposes evolutionary constraints on homomeric proteins. *Nat Struct Mol Biol.* **25**, 279–288 (2018).

IF: 12.109

A. Pósa, R. Szabó, K. Kupai, A. Csonka, Z. Szalai, M. Veszeka, S. Török, **L. Daruka**, C. Varga, Exercise Training and Calorie Restriction Influence the Metabolic Parameters in Ovariectomized Female Rats. *Oxid Med Cell Longev.* **2015**, 1–8 (2015).

IF: 4.593

G. K. Kis, A. H. Molnár, **L. Daruka**, J. Gardi, K. Rákosi, F. László, F. A. László, C. Varga, The osmotically and histamine-induced enhancement of the plasma vasopressin level is diminished by intracerebroventricularly administered orexin in rats. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* **463**, 531–536 (2012).

IF: 3.389

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem Daruka Lejla PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „Az antimikrobiális peptidekkel szemben kialakuló rezisztencia rendszer szintű vizsgálata” című disszertációját. Felelős szerzőként kijelentem, hogy Daruka Lejla jelentősen hozzájárult az alább felsorolt, a doktori eljárás alapjául szolgáló tudományos publikáció eredményéhez:

R. Spohn*, **L. Daruka***, V. Lázár, A. Martins, F. Vidovics, G. Grézal, O. Méhi, B. Kintses, M. Számel, P. K. Jangir, B. Csörgő, Á. Györkei, Z. Bódi, A. Faragó, L. Bodai, I. Földesi, D. Kata, G. Maróti, B. Pap, R. Wirth, B. Papp, C. Pál, Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* **10**, 4538 (2019). *megosztott első szerző

IF: 12.121

Igazolom továbbá, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023. 05. 02.

.....
Dr. Pál Csaba