

APORTUL GENOMICII ȘI PROTEOMICII ÎN PRODUCEREA NOILOR ANTIBIOTICE

Prof. Dr. Lucian Negruțiu

Clinica I Boli Infecțioase, UMF, Timișoara

REZUMAT

Acumularea actuală a unor multiple informații privind secvențele complete a moleculelor de ADN, provenind din genomele multor prokariote, a permis definirea întregului patrimoniu genetic al acestora. Colecția de date genomice a permis cunoașterea aprofundată a intimității arhitecturii moleculare a celulelor bacteriene, revelând structurile de bază genetice și metabolice care asigură viabilitatea acestor microorganisme. Informațiile genomice au permis detectarea unor căi noi de inhibare a creșterii și viabilității bacteriilor, amplificând numărul posibilelor ținte bacteriene ce vor fi folosite pentru crearea unor noi clase de antibiotice. Lucrarea de față examinează cum sunt aplicate conceptele și mijloacele genomicii experimentale în descoperirea de ținte antibacteriene, un prim pas necesar în dezvoltarea unor noi clase de antibiotice.

ABSTRACT

Complete DNA sequence information has now been obtained for several prokaryotic genomes, defining the entire genetic complement of these organisms. The collection of genomic data has provided new insights into the molecular architecture of bacterial cells, revealing the basic genetic and metabolic structures that support viability of the organisms. Genomic information has also revealed new avenues for inhibition of bacterial growth and viability, expanding the number of possible drug targets for antibiotic discovery. This review examines how genomic sciences and experimental tools are applied to antibacterial target discovery, the necessary first step in the development of new antibiotic classes.

INTRODUCERE

Bolile infecțioase, bacteriene și virale dețin o pondere importantă în patologia generală a mileniului al III-lea, cele mai frecvente fiind reprezentate în figura 1.

Antibioticoterapia actuală este într-o situație de impas existând argumente solide în favoarea acestei afirmații:

- Dezvoltarea/extinderea rezistenței față de toate clasele de antibiotice (AB), incluzând chiar și pe cele mai recente, limitează mult opțiunile pentru alegerea unui AB, corelate cu o prevalență tot mai crescută a infecțiilor. Ex. creșterea și extinderea rezistenței pneumococilor față de cefalosporine sau extinderea rezistenței stafilococilor față de glicopeptide.
- Din 1.450 noi molecule terapeutice introduse pe piața mondială în ultimii 25 de ani, doar 13 au fost produse antimicrobiene.

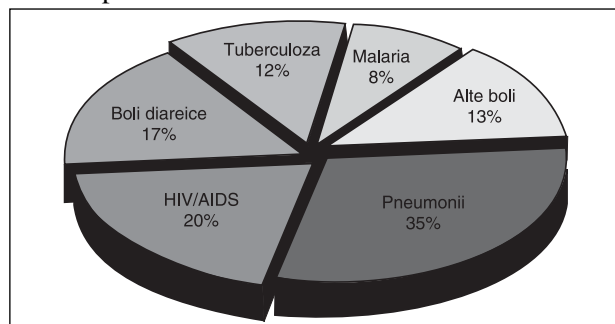


Figura 1

- Doar 5 AB noi sunt actualmente testate prin trialuri clinice și doar alte 18 se află în faze de studiu preclinic, comparativ cu cele peste 2.600 de medicamente deja utilizate în alte patologii.
- AB cu adevărat noi sunt tot mai puține, majoritatea celor noi fiind derivate din AB-le mai vechi.
- Problema devine și mai gravă datorită (re)emergenței de noi patogeni cu potențial rapid de răspândire. Din cele peste 130 de antibiotice existente pe piață doar aproximativ 30 își mai păstrează acțiunea asupra unui grup tot mai restrâns de germeni.

Câteva dintre mecanismele de dezvoltare a rezistenței la AB sunt prezentate în tabelul 1.

În ultimii 25 de ani, screeninguri efectuate asupra celulei bacteriene integrale (incluzând și un număr mare de studii genomice), alături de screeninguri, in vivo, ale țintelor – au fost folosite pentru a testa și a realiza biblioteci de compuși sintetici, în efortul de a obține noi structuri cu o potențială acțiune antimicrobiană. Majoritatea antibioticelor noi actuale sunt produși naturali sau semisintetici derivați din aceștia, asigurând o eficacitate antibacteriană temporară. Spre exemplu:

- apariția noilor fluorochinolone sau a penemilor demonstrează eficiența utilizării moleculelor AB sintetice noi.
- descoperirea oxazolidinonelor, cu primul reprezentant- Linezolidul, dar față de care se comunică, din anul 2005, multiple rezistențe.

Tabelul 1.

Unele mecanisme de rezistență bacteriană la antimicrobiene

Mecanisme biologice	Alterarea transportului AB-lor Modificări enzimatică	Multiplicarea pompelor de eflux Enzime degradante ale AB: ex. β -lactamazele Enzime modificatoare ale AB-lor ex. aminoglicozidele
Achiziționarea unor mecanisme genetice de rezistență	Mutații cromozomiale Plasmide Bacteriofagi; AND nud	Alterarea țintelor intracelulare: ex. alterarea situsurilor de legare ale AB. – Alterări ale enzimelor implicate în sinteza ADN. Transpozoni. Ex: Tn916 . – pt. gena de rezistență la Tetraciclină

- descoperirea diarylchinolinelor- ca inhibitori specifici ai ATP-sintetazei myco-bacteriilor, cu efect killing specific – printr-un mecanism de inhibare a țintei.

Ca urmare, se impune introducerea unor noi tehnologii de abordare a studiului și sintezei de molecule cu funcție anti-bacteriană care să lămurească:

- intimitatea structurală și de acțiune a patogenilor,
- modul prin care aceștia își dezvoltă progresiv mecanismele de rezistență.

Aceste noi tehnologii de abordare fac apel la mijloacele genomice și proteomice.

Cu se ocupă cele două domenii de cercetare?

Genomica: are ca obiect analiza sistematică și comprehensivă a structurii și funcției unui genom, efectuată în scopul identificării și înțelegerii rolului unor gene, iar

Proteomica: se ocupă cu analiza completă a componentelor unor proteine sau studiul setului complet de proteine codate de un genom. În plus, proteomica circumscrie: identificarea și cuantificarea proteinelor, determinarea localizării lor, a modificărilor, interacțiunilor, activităților precum și a funcțiilor acestor proteine. Legat de definirea proteomice, ca parte a geneticii moleculare, vom reaminti că:

Proteomul: reprezintă setul de proteine exprimat/codat de un genom. În timp ce genomul este static, proteomul se modifică continuu ca răspuns la acționări externe sau interne.

ETAPELE STUDIULUI GENOMIC

Etapele studiului genomic cuprind o serie de succesiuni, dintre care esențiale sunt:

- obținerea genomului microbial, identificarea țintei & validarea ei (compararea produselor genice),
- schițarea designului inhibitorilor specifici pentru ținta validată.

Studiile de proteomică au permis identificarea și înțelegerea unor mecanisme biologice de corelare dintre proteine, dimensiunile proteinelor și structura proteinelor cu funcțiile acestora. La ora actuală s-au acumulat un număr enorm de date de genomică și

proteomică care pot accelera tehnologiile de diagnostic și tratament sau de producere de noi molecule terapeutice. Dar concomitent a apărut, tot mai strident, necesitatea ca pletora de date acumulate să fie integrată în baze de date, să fie stocată și ușor disponibilă să fie multiplu analizată și să se asigure exploatarea și manipularea secvențelor biologice, a structurii proteinelor și acizilor nucleici din diverse genome, precum și a funcțiilor. Etapa finală a acestor procedee de investigare ar fi consemnarea datelor obținute în vederea translației lor în practica producerii de medicamente. (Stanley Fields „Proteomics in Genomeland“ Science 291: 1221-1224 Feb. 16, 2001)

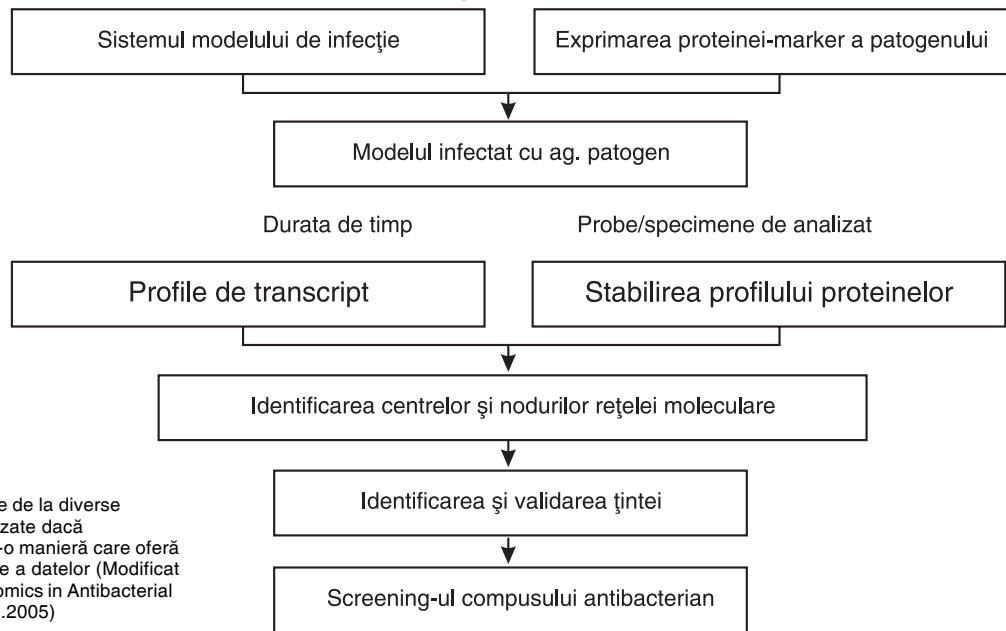
Genomurile integrate

Dimensiunile relativ mici ale genomului bacterian sunt convenabile pentru elaborarea acestor tehnologii și investigarea modificărilor moleculare suferite de o bacterie în timpul desfășurării procesului infecțios. În cele ce urmează vom prezenta o sinteză a respectivelor tehnologii privind transcrierea și exprimarea proteinelor precum și unele aspecte privind bazele moleculare ale patogenității microbiene. Datele obținute în urma utilizării noilor tehnologii pot fi integrate și analizate pentru a crea și testa modele de rețele moleculare. Înțelegerea și controlarea punctelor-cheie ale mecanismelor de patogenitate poate face ca ulterior aceste mecanisme să servească drept țintă pentru agenții antibacterieni. Medicamentele care acționează asupra unor asemenea ținte par avea un spectru relativ asemănător, reducând probabilitatea apariției unor fenomene de rezistență. (tabelul 2)

Genomica funcțională, genomica comparativă și mijloacele/procedurile proteomice sunt combinate în vederea identificării unor noi ținte și pentru selecția, dintre acestea, a celor mai potrivite pentru a produce noi inhibitori provenind din studiul specific al țintei. Aceste metode deschid noi căi pentru integrarea, într-un tot unitar, a disciplinelor de bioinformatică, genomică și proteomică cu mijloacele tradiționale ale biochimiei și geneticii, având drept obiectiv final producerea mai multor molecule cu acțiune antiinfecțioasă. Secvențe adiționale sunt disponibile în baze comerciale de date.

Tabelul 2.

Etapile cercetării genomice în realizarea unui compus antibacterian



NOTĂ: Seturile de date provenite de la diverse platforme pot fi integrate și analizate dacă experimentele sunt realizate într-o manieră care oferă un context adecvat de comparare a datelor (Modificat după Krishnanand Kumble- Genomics in Antibacterial Drug Discovery. Vol 6. pp. 33-35.2005)

Analizarea secvențelor genomice

Secvențializarea genomului bacterian este, până acum, rezultatul analizei secvențiale a mai mult de 50 de genomuri de germeni patogeni. Numărul secvențelor codante sau cadrele deschise de citire (ORF) ale genomului pot fi deduse și prezise din secvența genomică. Aceste ORF-uri sunt studiate pentru determinarea unor regiuni conservate a familiilor de proteine sau pentru precizarea unor caracteristici – cum ar fi unele structuri de membrană sau unele semnale secretoare.

Semnalele secretoare ar putea fi reprezentate de proteine ce conferă virulență, mai ales dacă sunt localizate la nivelul suprafeței celulare sau dacă sunt secretate (spre ex. ca enzime). Analiza tandemului de secvențe repetitive, arată că acestea sunt situate adesea la nivelul sau în vecinătatea unor gene de virulență și că modificări ale numărului de copii, care alterează exprimarea genelor de virulență, vor conduce la variații antigenice sau de alte tipuri de variații.

Acumularea informațiilor privind secvențele genomice ale unui număr tot mai mare de bacterii, atât patogene cât și nepatogene, a creat posibilitatea comparării secvențelor acestora și ca urmare, a obținerii unor informații multiple privind mecanismele virulenței. Aceste date nu s-au obținut doar prin analiza unui singur genom. Acele secvențe comune, care nu se regăsesc și la alte genuri de bacterii, pot reflecta caracteristici morfologice unice dar, la fel de bine și interacțiuni cu gazda. Compararea unor tulpini diferite, dar aparținând aceleiași specii bacteriene care infectează, *in vitro*, diverse țesuturi, poate conduce la identificarea unor gene diferite, aducând

informații asupra mecanismelor intime ale infectivității. Secvențele obținute din multiple izolate, dar aparținând unui singur patogen sunt evaluate pentru a obține noi informații asupra mecanismelor variabilității genetice prezente la anumite specii, facilitând, astfel, stabilirea unor corelații între genotipul și fenotipul caracteristic unui anumit patogen. Pentru utilizarea microtestelor de analiză a ADN, descoperirea unor noi ținte bacteriene și catalogarea genelor reprezintă primul pas. A doua etapă este reprezentată de:

Analiza exprimării transcriptului

Aprecierea exprimării nivelului de exprimare a transcriptului permite investigarea unui întreg mecanism biologic. Contextul în care fiecare genă este supra- sau sub-reglată permite consemnarea unor posibile funcții pentru alte noi gene. Microtestele, în combinație cu alte metode de izolare a ARNm bacterian, obținut din țesuturi infectate, ce exclud transcriptele gazdei, sunt extrem de utile pentru studiul exprimării genelor unui patogen. Aceste microteste au fost folosite pentru investigarea unor mecanisme de invadare a gazdei, permițând și investigarea unor mecanisme de apărare imunologică sau de supraviețuire ale gazdei. (P.A. Bryant și col., *Lancet*, vol. 4, pp. 100-111 (2004). Determinarea profilului transcriptelor a fost, de asemenea, folosită pentru identificarea diferențelor de răspuns dintre organisme-gazdă (vârstă, sex, și tipul de celulă) pentru același tip de patogen (sau tulpini diferite ale aceluiași patogen) sau pentru agenți patogeni diferiți. Determinarea acestor diferențe este importantă pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale infecției. Creșterea volumului bazei de date privind profilul

răspunsului la infecții cu diverși patogeni, în variate condiții și în diverse stadii ale evoluției infecției, permite descifrarea tot mai profundă a bazelor moleculare ale patogenității. Au fost puse la punct o serie de metode predictive pentru desemnarea unor modele de interacțiuni proteice, provenind din datele privind secvența și exprimarea transcriptelor unor patogeni. Pe măsură ce s-au acumulat o serie de date provenind de la diverse laboratoare, s-a impus necesitatea de utilizare a unor standarde comune pentru toți. Încorporarea unor transcripte cunoscute, începând cu simpla preparare a unor probe și continuând cu etichetarea și hibridizarea acestora, necesită elaborarea unor standarde calitative, realizate prin determinarea și gestionarea unor erori sistemice sau experimentale. Totuși, pentru modelarea unor rețele moleculare, este nevoie, în afara datelor obținute prin determinarea profilului transcriptelor și de obținerea de date privind exprimarea proteinelor, în scopul determinării cantitative a ARNm.

Complexitatea proteomului bacterian cuprinzând aproximativ 6.000 de specii moleculare este, pe scala de mărime, mai mică decât proteomul celulelor de mamifere, făcând posibilă obținerea unei exprimări globale a profilului proteinelor – cu ajutorul tehnologiilor de uz curent. *Electroforeza bidimensională (2-DE) combinată cu spectrometria de masă (MS) și robotica* permit utilizarea a unor geluri multiple precum și prelevarea și analizarea a sute de probe în fiecare zi. Compararea profilelor de exprimare a proteinelor poate fi obținută folosind *tehnologia 2-DE* prin marcarea a 2 probe, fiecare având o culoare diferită, și apoi prin procesarea lor pe același gel.

Unele tehnologii mai noi, cum ar fi *marcajul izotopic al afinității codate (ICAT) – cromatografia în fază lichidă/spectrometria de masă (LC/MS) și desorbția asistată prin laser al matricei celulei intacte, timpul de ionizare al spectrometriei de masă* au început a fi folosite pentru obținerea de profile proteice.

A fost realizat un sistem *de baze de date* ce înglobează datele otinute prin studiile microbiologice ce au utilizat tehnologii de tipul 2-DE/Ms, ICAT-LC/MS, precum și date de clasificare funcțională a proteinelor-provenite realizate pe baza datelor furnizate de studiile privind genomica, metabolismul și alte mecanisme biologice. Aceste baze de date sunt încontinuu actualizate. Vom detalia mai jos principiile unor tehnologii folosite de proteomică și genomică.

Etapa finală a acestor procedee de investigare este consemnarea datelor obținute în vederea traducerii lor în producerea de medicamente. (Stanley Fields „Proteomics in Genomeland“ Science 291: 1221-1224 Feb. 16, 2001).

SELECTAREA ȚINTEI FOLOSIND INFORMAȚIA GENETICĂ

Fiecare țintă nouă identificată prin secvențializare genetică, trebuie să îndeplinească câteva criterii de bază pentru a putea fi considerată o potențială țintă.

Țintele trebuie să realizeze 4 criterii: *esențialitatea, selectivitatea, spectrul și funcționalitatea.*

Există mijloace de identificare/consemnare/disponibile care înregistrează termenii codării ORF pentru proteine, incluzând tehnologiile de tip *Glimmer și TopPred* (în vederea predicției domeniilor de extindere a membranei și în mod similar, a proteinelor membranare). Un alt tip de consemnare folosește întregul genom pentru a evidenția direct asemănările cu proteine cunoscute folosind metodologii de tipul *BLASTX, BLASTN și TBLASTX.*

Aceste metode nu se bazează pe date prezumtive, asociate cu definirea segmentelor ORF, ci pe secvențele brute, pentru a putea confrunta domeniile genomice – ORF, comparându-le cu cele ale unor proteine cunoscute.

Procesul identificării și consemnării include, de obicei investigarea a 5 regiuni ale fiecărui ORF, pentru a defini codonii, poziția siturilor de legare a ribozomilor, a presupuselor secvențe – promotor și a secvențelor – terminator transcripționale.

Condiții pentru selectarea țintei

Secvența ADN asamblată trebuie stocată astfel încât să furnizeze informații privind localizarea ORF (open reading frame), dimensiunea, structura primară (de ex.: secvența de aminoacizi) și numărul de gene similare (orthologe și paraloge) din genom.

1. Ținta trebuie să fie *esențială* pentru creșterea, replicarea și viabilitatea microorganismului.
2. Ținta trebuie să fie *selectivă*. Selectivitatea se referă la ținte bacteriene care nu au un receptor specific în organismul animal. Selectivitatea este un criteriu pentru posibilele probleme de toxicitate care se pot ivi la compuși care inactivează ținta bacteriană cu activitate corespunzătoare în gazda animală.
3. Ținta trebuie să fie *prezentă în structura mai multor patogeni* asigurând un spectru adecvat pentru potențiali inhibitori. În principiu, țintele moleculare ale antibioticelor din comerț au ca loc de acțiune procesul translației, enzime ale sintezei peretelui bacterian, polimeraze ARN, topoizomeraza II sau ținte metabolice selectate, toate acestea fiind prezente la un număr important de patogeni.

Au fost conturate două direcții de bază, acestea fiind cele mai eficiente în folosirea informației genetice:

Genomica comparativă se referă la un set de mijloace bioinformatic care permit compararea unui genom bacterian cu un set existent de informație genomică, obținut în urma secvențializării, atât a eucariotelor cât și a procariotelor. În linii mari, genetica comparată se bazează pe similaritatea secvențelor genetice pentru a atribui o funcție unei gene țintă, prin comparație cu gene dintr-o bază de date existentă. Această comparație poate fi făcută la nivelul secvenței ADN, dar uneori necesită comparații liniare ale translației proteinelor, între secvența căutată și o secvență din baza de date.

Genomica funcțională se referă la inhibarea unor gene pentru a afla dacă acestea sunt vitale pentru viața bacteriei în medii de cultură sintetice sau dacă sunt necesare creșterii în infecția unei gazde. Genetica funcțională se bazează pe tehnici prin care se inactivează o genă, ce includ:

- disrupția genelor;
- exprimarea condiționată;
- izolarea mutațiilor condiționat letale.

DEFINIREA *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A GENELOR ESENȚIALE

Genele esențiale pentru creșterea și viabilitatea bacteriilor pe medii de cultură sunt implicate în creșterea și viabilitatea lor în gazdele infectate.

Din acest motiv, genele esențiale *in vitro* constituie principalul obiectiv al cercetărilor recente pentru descoperirea de noi agenți antimicrobieni.

Un al doilea set de gene, codificând funcții esențiale pentru supraviețuirea agentului patogen la nivelul gazdei, dar care nu sunt necesare pentru creșterea *in vitro*, reprezintă o largă colecție de gene țintă care nu au fost „exploatate” în era pregenomică.

Conceptul principal al metodelor moderne de studiu genomic *in vivo* de este utilizarea unui sistem eficient de transpozoni pentru generarea de inserții aleatorii în cadrul genomului. Pentru obținerea unei descrieri complete a genelor esențiale pentru creștere, replicare și supraviețuire în organismul gazdelor infectate au fost necesare noi instrumente genetice.

Colecției de mutații obținuți prin aceste procedee îi este permisă selectiv, dezvoltarea, astfel încât mutații incapabili să supraviețuiască post-mutageneză sunt eliminați din populație.

Inserțiile în genele non-esențiale (de ex. inserțiile viabile) sunt detectate de o „urme” moleculară, folosind PCR pentru amplificarea segmentelor de ADN – constituite, prin inserția de transpozoni (transportorul primar) și locații definite de la nivelul genomului hibridizat de țintă primară. Prin reacții PCR au fost multiplicat gene exprimate individual.

Metode genomice de identificare a țăntelor esențiale

Metodele genomice pentru identificarea țăntelor esențiale necesare supraviețuirii în organismul gazdei se bazează pe două strategii:

A. Strategii bazate pe exprimarea genelor bacteriene

B. Strategii bazate pe funcția genelor bacteriene

În metodele bazate pe exprimare se obține o imagine a expresiei genetice într-un anumit mediu infectat; totuși, aceste gene nu indică care dintre funcțiile exprimate sunt critice pentru supraviețuirea în gazda infectată. Aceste abordări necesită pasul adițional al constituirii mutației directe în gena țintă și o reevaluare în modelele de infecție *in vivo* pentru a confirma modelul.

În metodele bazate pe funcție, mutații sunt fixați direct într-un anumit mediu-gază; identificarea directă a genelor mutante prin complementare sau prin analiza inversă a PCR permite studiul ulterior al genelor țintă, fără necesitatea confirmării atenuării observate.

Metode genomice bazate pe exprimarea genomică sunt reprezentate prin:

- tehnologia exprimării *in vivo* = VIVE = IVET și
- inducția fluorescență diferențiată (DFI) care identifică promotori ai genelor, condițional activi, prezenți în mediul gazdei dar absenți în condiții de laborator.

Odată identificați, acești promotori pot fi secvențializați, iar genele a căror exprimare se află sub controlul lor, pot fi identificate prin analiza secvențelor sau prin analiză comparativă.

Metodele de identificare a promotorilor pot fi configurate prin simpli «raportori» cum ar fi gena *lac Z*, al cărui produs (β galactozidază) are o activitate ce poate fi ușor monitorizată în mediile de laborator.

Condiții produse *in vitro*, care se comportă ca surrogat ale condițiilor *in vivo*, pot fi ulterior realizate printr-un set de promotori, activați prin expunerea la anumite condiții speciale de creștere. **Tehnicile bazate pe funcția genelor pentru identificarea țăntelor bacteriene prin metode „VIVE” (in vivo) sunt:**

1. *Metoda DRDA* (analiza ARN diferențial)
2. *STM* (mutageneza identificată specific)
3. *DFI* (inducția fluorescență diferențiată)
4. *SMIT* (tehnologia identificării markerilor în funcție de dimensiune) utilizată pentru identificarea țăntelor VIVE se bazează pe o selecție negativă ce determină fitnessul *in vivo* al mutațiilor individuali marcați, printr-o moleculă de dimensiuni prestabilite.
5. *PCR multiplex* permite evaluarea „terminațiilor libere” obținute din probele de țesut fără a fi necesare culturi pentru bacteriile obținute; este posibil să apară pierderi aleatorii de «terminații libere» ale mutațiilor în probele recoltate.

Metodele proteomicii

Multe tehnici proteomice se axează pe utilizarea proteinelor ca „momeală“ pentru obținerea interacțiunilor proteice. Exemple:

- folosirea cipurilor de silicon marcate cu o proteină cunoscută,
- fracționarea unei proteine intracelulare și
- identificarea interacțiunilor proteice specifice prin spectrometria de masă

Testele automate 2-hybrid furnizează o probă care măsoară interacțiunea proteină-proteină, având ca rezultat apariția unui efect terapeutic. Forța acestei abordări pentru validarea țintei se bazează pe faptul că pot fi obținuți „binderi“ (elemente de legătură) ale oricărei proteine țintă.

Probele de înlocuire competitivă pentru găsirea componentelor moleculare de dimensiuni reduse, ce se leagă mai puternic decât peptidul inhibitor, constituie baza pentru noi investigații în detectarea inhibitorilor țintelor proteice:

- marcajul izotopic al afinității codate (ICAT)
- cromatografia în fază lichidă
- spectrometria de masă (LC/MS)
- desorbția asistată prin laser al matricei celulei intacte
- timpul de ionizare al spectrometriei de masă

Noi strategii proteomice pentru depistarea și validarea țintelor:

- producerea unei peptide care blochează funcția de sinteză a țintei
- producerea de ARN-antisens pt. subreglarea exprimării genei-țintă
- interacțiunea proteină-proteină: este o metodă de apreciere a corelației unor modificări, realizate în exprimarea proteinelor, prin care, într-o celulă, fiecare proteină își poate exercita influența, într-un anumit interval de timp, asupra unei alte proteine.

Au fost izolate complexe multi-proteinice folosind markeri de afinitate, urmate de identificări ale proteinelor din complex – utilizând spectrometria de masă. Datele au fost folosite pentru a modela o rețea de interacțiuni proteice ce permite identificarea funcțiilor celulare ale unor noi proteine și precizarea sau derivarea unor noi mecanisme biologice.

Necesitatea unor abordări sistematice

Dezvoltarea unor noi substanțe antibacteriene va depinde de o mai bună înțelegere a fiziologiei bacteriene și a biochimiei acestora în contextul infecției gazdei. Realizarea unui sistem integrat de date provenind din variate surse și „platforme tehnologice“ sau a unor date publicate în literatura de specia-

litate a fost informatizată prin prelucrare computerizată (*J. Starck și col. Trends Biotechnol., vol. 21, pp. 290-293. 2003*). Construcția de modele ce utilizează date provenind de la o singură platformă, spre ex., profilul transcriptelor, nu este suficientă pentru a realiza o rețea de modele, mai ales când se compară exprimarea genelor în termenii de transcripte și proteine care, însă, se corelează insuficient, mai ales datorită unor diferențe existente între ratele de turnover a transcriptelor și cele ale proteinelor corespunzătoare. În ultima vreme s-a reușit, totuși, construcția unor modele utilizând date provenite de la platforme multiple – exprimări de transcripte și interacțiuni proteină-proteină – obținute la intervale diferite de timp din diverse laboratoare, care au folosit modele experimentale cu un design diferit. Totuși, variațiile de sensibilitate și de dinamică lineară dintre platforme fac deosebit de dificilă compararea rezultatelor obținute prin utilizarea unor tehnologii diferite. Apare deci provocarea pentru regândirea unui design experimental în momentul în care datele, privind inclusiv transcripte și exprimări de proteine, obținute de pe multiple platforme și din stadii diferite ale infecției să fie integrate și analizate, dacă designul experimental permite un context comparativ. Acest lucru presupune ca fiecare platformă de cercetare să folosească același desen experimental și același control care să permită integrarea într-un sistem a datelor obținute. Metodele de integrare a datelor provenite din variate surse și observații experimentale sunt cruciale pentru realizarea unor rețele de modele moleculare. Aceste modele pot produce criterii de validare a experimentelor, de folosire a unor anumite tehnologii, de apreciere integrativă a rezultatelor obținute etc.

Validarea țintelor

Validarea unor ținte antimicrobiene, care urmează identificării acestora, poate fi realizată folosind diverse strategii. Inactivarea proteinelor bacteriene reprezintă un punct de control în rețelele moleculare și se poate efectua prin diverse strategii de knock-down, spre exemplu prin interferența cu ARN. Validarea țintelor poate reprezenta un potențial pentru identificarea unor alte ținte subsidiare ale aceluiași proces patologic, permițând sinergia unor AB și posibilitatea reducerii apariției fenomenului de rezistență la antibiotice. Patogenii a căror genă-țintă a fost inactivată pot fi folosiți astfel pentru reducerea funcției de virulență și de infectivitate. Validarea țintelor va putea fi analizată ulterior focalizându-se acțiunile asupra ADN-lui și asupra studierii proteinelor, în scopul de a determina efectele inactivării țintei asupra altor componente ale procesului patogenic, ce vor fi

interceptate secvențial, folosind seturi de probe obținute de la modelele animale infectate.

Aproape toate antibacterienele utilizate în mod curent sunt compuși care au fost identificați prin studii screening efectuate pe celule întregi. Compușii selectați în vederea folosirii lor în dezvoltarea unor anumite antibiotice nu acționau pe anumite ținte celulare dar inhibau un mare număr de patogeni. Această metodă de screening identifica, de cele mai multe ori, aceeași clasă de antibacteriene. O mai bună înțelegere a mecanismelor biologice fundamentale la nivel molecular a avut drept rezultat descoperirea unor noi clase de medicamente dotate cu o mare specificitate și eficacitate și cu puține efecte secundare. Un compus antibacterian ideal trebuie să posede o acțiune specifică de țintă, iar acțiunea sa să nu poată fi afectată de mecanismele de rezistență antibacteriene. În plus, un asemenea compus nu trebuie să producă efecte adverse asupra gazdei. Descoperirea unor noi compuși antibacterieni va depinde de fiabilitatea și sensibilitatea testelor, unde fiecare identificare a țintelor trebuie să folosească un sistem de investigare „cell-free“, evaluând fiecare mecanism de cuplare/legare sau de activitate. Legarea specifică a compușilor-candidați trebuie să fie testată pe proteine aparținând unei aceleiași familii, folosind tehnicile de „protein microarrays“, prin care mai multe proteine pot fi evidențiate prin spoturi obținute din aceeași probă.

Este posibil ca AB-le naturale să prezinte doar 20 de gene sau produse genice, dar care care, pe parcursul evoluției, au permis selectarea unor ținte ce pot doar inhiba creșterea unor organisme competitive. Pentru acele ținte, asupra cărora organismele-producătoare de AB nu pot acționa, se acționează azi prin compuși de sinteză care s-au dovedit a fi o sursă mai bună de inhibitori. Dacă șansele unui microb ce posedă enzime ce pot distruge acești compuși/AB sunt minimale, efluxul medicamentelor poate fi un mijloc de a evacua AB- pentru unele dintre acestea. Un inhibitor poate fi desemnat pentru o țintă bine definită structural, ca urmare a unor tehnici chimice combinatorii, utilizate pentru sinteza unor biblioteci de produse/clone recombinante destinate screening-ului. Progresele realizate prin tehnologia chimiei combinatorii și a altor metode de înaltă rezoluție vor facilita substanțial potențialul antibiotic al noilor produși obținuți prin aceste tehnologii.

Strategia integrării datelor provenite de pe platforme multiple

Renunțarea mai multor companii farmaceutice de a continua cercetările în vederea obținerii de noi AB se datorează, în parte, eșecului programelor construite pe baza unor modele, din cauza raportului cost/calitate

și a producerii unor medicamente noi care să prezinte eficacitate în clinică. Cheia viitoarelor descoperiri în terapia bolilor infecțioase se bazează pe realizarea unor aplicații ale noilor tehnologii ce vor combina datele globale obținute în urma cercetărilor – cu integrarea informațiilor provenite prin secvențializarea genomului patogenilor, a unor genome funcționale și a unor studii de profiling ale transcripților și proteinelor. Un asemenea sistem de investigație poate fi folosit pentru a înțelege interacțiunile dintre patogeni și gazdele lor în timpul desfășurării procesului infecțios. Traducerile informațiilor, bazate pe computer în detalii de uz practic vor oferi date asupra unor procese intime de identificare a unor noi ținte antibacteriene.

Vechea paradigmă a dezvoltării unui spectru larg antibiotic sau a reducerii costurilor medicamentelor, care să fie eficace împotriva unor patogeni multipli își poate găsi o nouă abordare prin înalta selectivitate a medicamentelor, ce are avantajul particularizării acțiunii pe un anumit patogen. Aceste realizări vor avea un impact semnificativ asupra unor microorganisme de tipul *Mycobacterium tuberculosis*, care generează azi mari probleme, mai ales în situațiile infecțiilor apărute la imunodepresia HIV/AIDS pozitivi. În acest sens menționăm identificarea diarylchinolinelor – ca inhibitori specifici ai ATP-sintetazei mycobacteriilor ce își demonstrează eficacitatea killing-ului specific asupra acestor tipuri de patogeni, printr-un mecanism de inhibare a țintei. (K. Andries și col., *Science*, vol. 307, pp. 223-227 (2005).

Respectivul mod de acțiune al acestor molecule terapeutice poate contribui într-un procent mult mai mic la creșterea generală a rezistenței datorită specificității țintei lor. Mai mult, combinarea unor medicamente care acționează asupra unor puncte de control a unor doi sau mai mulți patogeni, într-o manieră specifică, poate bloca sau întârzia apariția rezistenței la AB.

CONCLUZII

Bolile infecțioase continuă să rămână o problemă de sănătate publică prin emergența și reemergența lor. Această problemă poate fi efectiv influențată prin utilizarea unor strategii comune, larg aplicabile tuturor patogenilor, prin folosirea cât mai extensivă a noilor tehnologii de identificare rapidă a unor noi agenți antibiotici.

Glosar de termeni

Metoda secvențializării shotgun: analiză care folosește secvențe de dimensiuni foarte mici, alese

aleator, a unor piese/fragmente clonate din genom, fără a ști dinainte din ce parte a unui cromozom provine respectivul fragment.

Spectometria de masă: tehnică folosită pentru măsurarea și analiza unor molecule. Tehnica implică introducerea unei energii suficiente într-o țintă moleculară pentru a produce ionizarea și dezintegrarea acesteia. Fragmentele moleculare astfel rezultate sunt analizate, pe baza masei lor

moleculare, pentru a produce structuri „fingerprint“ moleculare.

Secvențe ortholog: secvențe omologe aparținând unor specii diverse, care au provenit dintr-o genă ancestrală comună, în decursul dezvoltării speciilor. Ele pot avea sau nu funcții similare

Secvențe paralog: secvențe omologe din sânul unei singure specii, produse prin duplicarea peptidului codat de o genă.

BIBLIOGRAFIE

1. **Karin Sauer** – The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol*, 2003, 4(6): 219.
2. **Hayes F** – Transpozon-based strategies for Microbial functional genomics and proteomics. *Annual Review of Genetics*, December 2003, Vol. 37:3-29
3. **Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P** – Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999; 181:5993–6002.
4. **Wen ZT, Burne RA** – Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:1196–1203. doi: 10.1128/AEM.68.3.1196-1203.2002.
5. **Otto K, Silhavy TJ** – Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:2287–2292. doi: 10.1073/pnas.042521699.
6. **Hengge-Aronis R** – Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66:373–395. doi: 10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002.
7. **Stanley Fields** – Proteomics in Genomeland. *Science*, 291: 1221-1224 Feb. 16, 2001.
8. **Schmid M** – *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2, 529-534.
9. **Ji Y, Marra A, Rosenberg M, Woodnutt G** – *J Bacteriol*, 1999, 181, 6585-6590.
10. **Ji Y, Zhang B, Warren P, Woodnutt G, Rosenberg M** – In: American Society for Microbiology General Meeting, 2000, Los Angeles, CA.
11. **Du W, Wallis N, Mazzulla M, Chalker A et al** – *Eur J Biochem*, 2000, 267, 222-227.
12. **Manger I, Relman D** – *Curr Opin Immunol*, 2000, 12, 215-218.
13. **Buysse, J, Benton B, Zhang J, Bond S, Winterberg K, Burke C, Christian T** – In: American Society for Microbiology General Meeting, 1999, Chicago, IL.
14. **Gresham H, Lowrance J, Caver T, Wilson B et al** – *J Immunol*, 2000, 164, 3713-3722.
15. **Andries K et col** – *Science*, vol. 307, 223-227, 2005.
16. **Bryant PA et col** – *Lancet*, vol. 4, 100-111, 2004.
17. **Kumble K** – Genomics in Antibacterial Drug Discovery. Vol 6. 33-35.2005.