

Bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät lääkekehityskohteena

Kerttu Riihko

Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma

Turun Yliopisto

Biolääketieteen koulutusohjelma

Lääketieteellinen tiedekunta

Biolääketieteen laitos

16.6.2024

Turku

Kandidaatin tutkielma

Oppiaine: Biolääketiede

Tekijä: Kerttu Riihko

Otsikko: Bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät lääkekehityskohteena

Ohjaaja: Arto Pulliainen, Dosentti, FT

Sivumäärä: 31 sivua

Päivämäärä: 16.6.2024

Antibiootit ovat yleisin bakteerien aiheuttamien sairauksien hoidossa käytetty lääkeryhmä. Antibioottiresistenssi on kasvava ongelma, joka uhkaa bakteerien aiheuttamien sairauksien hoitoa. Yhä useammat bakteerit ovat antibiooteille resistenttejä ja esimerkiksi vuonna 2019 resistenttien bakteerien aiheuttamia kuolemia oli arviolta 1,27 miljoonaa. Kasvavan resistenttiysongelman lisäksi toinen antibioottien käytön ongelma on niiden laaja-alainen kohdevaikutus myös elimistön hyviin bakteereihin. Antibiootit tuhoavat taudinaiheuttajabakteerien lisäksi myös esimerkiksi suolistobakteereja, joilla on positiivinen vaikutus elimistön toimintaan. Bakteerien aiheuttamien sairauksien hoitoon tarvitaan uusia lääkeaineita, jotka kohdentuvat sairauden aiheuttaneeseen bakteeriin.

Bakteerisolun sisällä toimivia toksiini-antitoksiinijärjestelmiä esiintyy lähes kaikissa bakteerilajeissa ja kullakin lajilla on sille tyypilliset toksiini-antitoksiinijärjestelmät. Ne koostuvat bakteerin kasvua rajoittavasta tai sen tappavasta toksiinista ja sitä neutraloivasta antitoksiinista, jotka normaalitilassa muodostavat kompleksin, jossa toksiini ja antitoksiini ovat toisiinsa sitoutuneena. Kompleksin tiedetään hajoavan bakteerien kokemissa stressitilanteissa, kuten esimerkiksi faagi-infektiossa tai ravintostarvaatiossa. Ajatellaan, että yksittäisten bakteerien kasvun hidastuminen tai kuolema hyödyttää bakteeripopulaatiota. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien merkitys bakteerisolun toiminnan kannalta on kuitenkin jäänyt vielä suurelta osin tuntemattomaksi.

Bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat lupaava lääkekehityskohde. Tällä hetkellä pyritään kehittämään toksiini-antitoksiinijärjestelmiin kohdentuvia lääkeaineita, jotka estäisivät toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen esimerkiksi asettumalla ja antitoksiinin väliin, allosteerisesti antitoksiinin tai toksiinin rakennetta muuttamalla tai kiihdyttämällä antitoksiinin hajotusta. Tällöin toksiini pysyy vapaana ja tappaa bakteerisolun. Tällaisia lääkkeitä ei ole vielä kliinisessä käytössä, mutta prekliinisiä lääkekehitystutkimuksia on paljon. Toksiini-antitoksiinijärjestelmään kohdistetut lääkkeet tarjoaisivat vaihtoehdon antibiootihoidolle. Näillä lääkkeillä olisi mahdollista myös kohdentaa lääkevaikutus patogeenisiin bakteereihin ja säästää elimistölle hyödylliset bakteerit.

Tutkielmani tavoitteena on kuvata toksiini-antitoksiinijärjestelmien peruspiirteet ja tuoda esiin muutamia mielenkiintoisia toksiini-antitoksiinijärjestelmiin keskittyviä prekliinisiä lääkekehitystutkimuksia.

Avainsanat: bakteeri, infektio tauti, lääkekehitys, toksiini-antitoksiinijärjestelmät

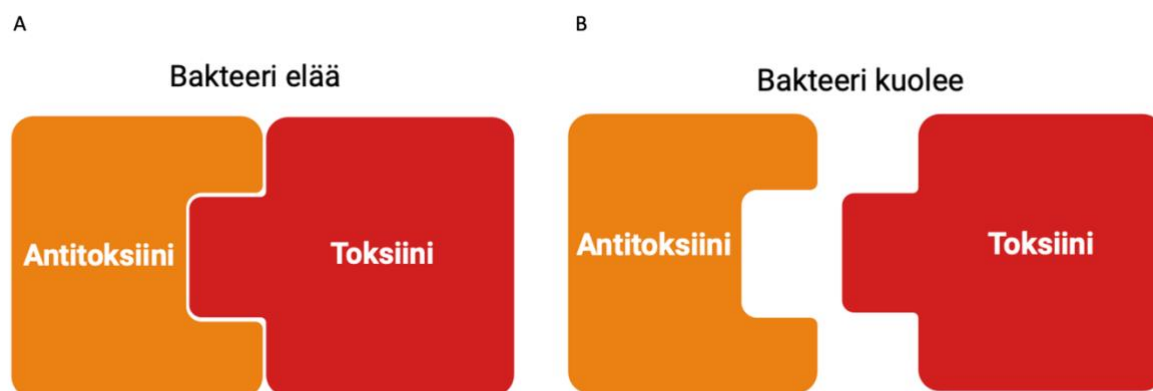
Sisällysluettelo

1	Johdanto	5
2	Bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät	7
2.1	Toksiini-antitoksiinijärjestelmien luokittelu	7
2.2	Toksiini-antitoksiinijärjestelmien toiminta ja merkitys bakteerisoluisissa	9
2.3	Toksiini-antitoksiinijärjestelmien säätely bakteerisoluisissa	11
2.4	Toksiinien vaikutukset bakteerisoluisissa	13
3	Prekliinisen vaiheen lääkekehitystutkimukset	15
3.1	MbcTA toksiini-antitoksiinijärjestelmä	15
3.2	HigBA toksiini-antitoksiinijärjestelmä	18
3.3	VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmä	20
3.4	CreTA toksiini-antitoksiinijärjestelmä	22
3.5	RelBE toksiini-antitoksiinijärjestelmä	23
3.6	MazEF toksiini-antitoksiinijärjestelmä	25
4	Johtopäätökset	27
	Lähteet	28

1 Johdanto

Antibioottiresistenssi on kasvava ongelma, joka uhkaa nykyajan terveydenhuoltoa. Antibioottiresistenssi tarkoittaa, että bakteeri pystyy vastustamaan antibioottia, jolloin se tulee sille resistentiksi. Tällöin kyseistä antibioottia ei voida enää käyttää sille resistentin bakteerin hoidossa. Mitä yleisemmäksi antibioottiresistentit bakteerit tulevat ja mitä suurempi niiden määrä on, sitä vaikeammaksi niiden aiheuttamien sairauksien hoito tulee ja ihmiset voivat kuolla tavanomaisiin infektioihin, kuten esimerkiksi keuhkokuumeeseen. Osa bakteereista voi olla jopa moniresistenttejä, joka tarkoittaa bakteerin kykyä vastustaa monia eri lääkkeitä. Euroopassa kuolee vuosittain noin 33 000 ihmistä antibiooteille resistenttien bakteerien aiheuttamiin sairauksiin. Tästä huolimatta Suomessa antibioottien teho on edelleen hyvä, mutta muualla maailmassa tilanne on paikoitellen päinvastainen ja antibiooteille resistenttien bakteerien aiheuttamien kuolemien määrä oli yli 1,27 miljoonaa vuonna 2019. Resistentsiysongelma on vain pahenemassa, minkä vuoksi bakteerien aiheuttamiin sairauksiin tarvitaan uusia lääkkeitä. (1,2)

Yksi lupaava vaihtoehto antibiooteille on bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmiin vaikuttavat lääkkeet. Toksiini-antitoksiinijärjestelmät koostuvat bakteerin kasvua rajoittavasta tai sen tappavasta toksiinista ja sitä neutraloivasta antitoksiinista, jotka normaalitilassa muodostavat kompleksin, jossa toksiini ja antitoksiini ovat toisiinsa sitoutuneena (Kuva 1.). Kun kompleksi hajoaa, toksiini ja antitoksiini eroavat toisistaan ja toksiini pääsee tappamaan bakteerin tai häiritsemään sen kasvua (Kuva 1.).



Created with BioRender.com

Kuva 1. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien peruseriaate. A) Toksiini-antitoksiinijärjestelmä koostuu toksiinista ja antitoksiinista, jotka muodostavat kompleksin, jossa antitoksiini on kiinnittynyt toksiiniin ja estää sen toksisen vaikutuksen. B) Kun kompleksi hajoaa ja antitoksiini irtoaa toksiinista, toksiini vapautuu ja saa aikaan sille tyypillisen toksisen vaikutuksen, joka tappaa bakteerin tai rajoittaa sen kasvua.

Eri bakteerilajeilla on niille tyypilliset toksiini-antitoksiinijärjestelmät, jotka vaihtelevat eri lajien välillä. Ensimmäiset toksiini-antitoksiinijärjestelmät löydettiin 1980-luvulla, minkä jälkeen niihin liittyvää tutkimusta on tehty paljon. On havaittu, että toksiini-antitoksiinikompleksi hajoaa bakteerin kokemissa stressitilanteissa, kuten faagi-infektiossa ja ravintostarvaatiossa. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien merkitys on kuitenkin jäänyt vielä suurelta osin tuntemattomaksi ja vielä todistamatta olevia strategioita niiden merkityksestä on paljon. Kuitenkin ajatellaan, että toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat osana mekanismia, jossa yhden bakteerisolun kuolema edesauttaa populaation selviytymistä. (3)

Koska toksiini-antitoksiinikompleksin hajoaminen aiheuttaa käytännössä joko bakteerin kuoleman tai kasvun estymisen, on se herättänyt ajatuksen näiden järjestelmien hyödyntämisestä lääkekehityskohteena. Koska kullakin bakteerilajilla on yleisesti ottaen sille ominaiset toksiini-antitoksiinijärjestelmät, voidaan näihin järjestelmiin vaikuttavan mahdollisen lääkeaineen vaikutus kohdentaa vain haluttuun bakteeriin. Useita lääkekehitystutkimuksia on tehty ja paljon tutkimusta tehdään edelleen. Toksiini-antitoksiinijärjestelmiin kohdennetut lääkeainemolekyylit voivat saada vaikutuksen aikaiseksi monella tavalla. Ne voivat esimerkiksi estää kompleksin muodostumisen. asettamalla toksiinin ja antitoksiinin väliin, estää antitoksiinin toiminnan tai estää toksiinin toimintaa tilanteissa, joissa se on bakteerille hyödyllinen. (3) Vaikka tutkimusta on tehty jo pitkään, ei yhtäkään toksiini-antitoksiinijärjestelmiin vaikuttavaa lääkemolekyyliä ole kliinisen vaiheen tutkimuksissa. Prekliinistä tutkimusta tehdään silti paljon ja tieto toksiini-antitoksiinijärjestelmistä kasvaa kokoajan.

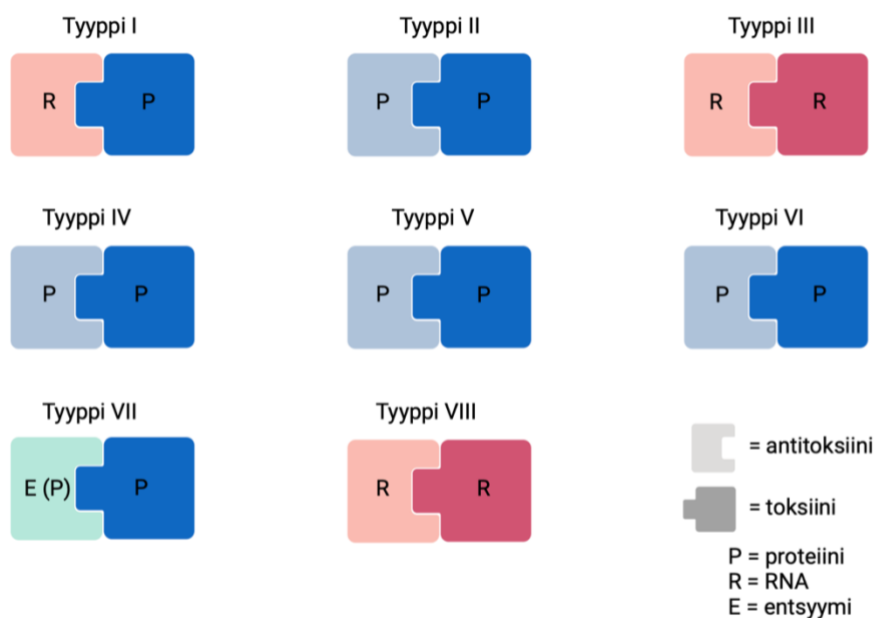
Työni tavoitteena on kuvailla toksiini-antitoksiinijärjestelmien peruspiirteitä ja esitellä kuusi mielenkiintoista järjestelmää, joihin kohdistuu lääkekehitystutkimuksia. Työssäni toksiini-antitoksiinijärjestelmien peruspiirteiden kuvailuun on käytetty katsausartikkeleita, sillä kattavien perustietojen löytäminen pelkkien alkuperäisartikkelien avulla osoittautui haastavaksi.

2 Bakterien toksiini-antitoksiinijärjestelmät

Toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat pieniä geneettisiä kokonaisuuksia, joita esiintyy suurissa määrin bakteerin genomissa. Toksiini-antitoksiinijärjestelmä (engl. toxin-antitoxin system) koostuu kasvua rajoittavasta toksiinista ja sitä vastaavasta antitoksiinista. Toksiini-antitoksiinijärjestelmiä koodaavia geenejä sijaitsee sekä plasmideissa että bakteerien kromosomeissa. (4) Toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on löydetty lähes kaikista eri bakteerilajeista ja usein eri lajit tuottavat niille tyypillisiä muista lajeista eroavia toksiini-antitoksiinijärjestelmiä, mutta lajien väleillä on myös samankaltaisuutta (5). Useimmiten toksiini inhiboi bakteerille tärkeitä solunsisäisiä toimintoja ja antitoksiini estää vastintoksiininsa vaikutuksen, jolloin muodostuu toksiini-antitoksiinikompleksi (3). Ensimmäiset toksiini-antitoksiinijärjestelmät löydettiin 1980-luvulla, mutta niiden merkitys oli pitkään tuntematon (3,5). Aluksi ajateltiin, että toksiini-antitoksiinijärjestelmä on kahdesta geenistä koostuva tekijä, joka edistää itsenäisten plasmidien ylläpitoa, mutta edellisen vuosikymmenen aikana on löydetty suuri määrä uusia toksiini-antitoksiinijärjestelmiä ja tieto niiden merkityksestä bakteerisolujen toiminnalle on kasvanut (3).

2.1 Toksiini-antitoksiinijärjestelmien luokittelu

Toksiini-antitoksiinijärjestelmät jaetaan kahdeksaan eri tyyppiin (tyypit I-VIII) ominaisuuksiensa ja toimintamekanisminsa mukaan. Antitoksiinit ovat joko RNA:ta (tyypit I, III ja VIII) tai proteiineja (tyypit II, IV-VII) ja toksiinit pääsääntöisesti proteiineja (tyypit I-VII) (Kuva 2.). (6)



Created with Biorender.com

Kuva 2. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien tyypit I-VIII. Toksiinit ja antitoksiinit ovat joko RNA:ta tai proteiineja ja niiden ominaisuudet vaihtelevat tyypeittäin.

Tyypin I toksiini-antitoksiinijärjestelmien antitoksiinit ovat ei-koodaavaa RNA:ta ja ne on transkriptoitu vastakkaiseen suuntaan verrattuna toksiinin geenin transkriptioon. Antitoksiinit pystyvät kiinnittymään toksiinin lähetti-RNA-molekyyleihin ja muodostamaan kaksijuosteista RNA:ta, mikä aiheuttaa toksiini-lähetti-RNA:n hajotuksen tai estää sen kiinnittymisen ribosomiin, jolloin toksiinin vaikutus estyy. Tyypin I toksiinien ajatellaan kuuluvan kahteen eri ryhmään, joista toinen sijaitsee solukalvolla ja toinen solulimassa. Kalvolle sijoittuvat tyypin I toksiinit aikaansaavat vasteena solukalvon depolarisaation tai läpäisevyyden muutoksen. Solulimassa sijaitsevat toksiinit aiheuttavat DNA:n ja RNA:n hajoamista. Tyypin I toksiini-antitoksiinijärjestelmiä ovat muun muassa *hok/sok*, *SymE/SymR*, ja *zor/orz*. (6)

Tyypin II toksiini-antitoksiinijärjestelmissä sekä toksiini että antitoksiini ovat proteiineja. Tyypin II järjestelmät ovat eniten tutkittu toksiini-antitoksiinijärjestelmien tyyppi ja niitä on määrällisesti eniten. Ne koodautuvat samasta, kahdesta geenistä koostuvasta operonista, jotka ovat joko limittäin tai muutaman emäksen välein. Toksiini ja antitoksiini muodostavat vakaan proteiini-proteiinikompleksin, mutta kompleksin antitoksiini on toksiinia huomattavasti epävakaampi ja sitä tuotetaan jatkuvasti toksiinin neutraloimiseksi. Kun bakteerisolun altistuu epävakaalle olosuhteille, pystyvät proteaasit hajottamaan antitoksiinin, jolloin toksiini pääsee vapautumaan kompleksista ja saamaan aikaan bakterisidisen tai bakteriostaattisen vaikutuksen. Suurin osa tämän tyypin antitoksiinigeneistä sijaitsee ylävirtaan toksiinigeneihin nähden. Tähän on kuitenkin myös poikkeuksia. *CcdA/CcdB* on ensimmäinen löydetty toksiini-antitoksiinijärjestelmä ja se kuuluu tyyppiin II. (6) Muita tyypin II toksiini-antitoksiinijärjestelmiä ovat esimerkiksi *MbcTA*, *HigBA* ja *VapBC* (7–9)

Tyypin III toksiini-antitoksiinijärjestelmissä sekä toksiini että antitoksiini ovat RNA:ta. Antitoksiini tarttuu suoraan toksiiniin ja inhiboi siten sen toksisuuden. Ensimmäinen löydetty tyypin III toksiini-antitoksiinijärjestelmä on *toxI/ToxN*, joka aktivoituu bakteriofagien aiheuttaman infektion aikana. Tyypin III toksiini-antitoksiinijärjestelmät on jaettu toksiinien emäsjärjestyksien samankaltaisuuksien perusteella kolmeen ryhmään: *toxI/ToxN*, *cptI/GptN* ja *tenpI/TenpN*. *In silico*-tutkimukset ovat osoittaneet, että tyypin III toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on määrällisesti paljon ja ne ovat yleisiä monissa eri bakteereissa. (6)

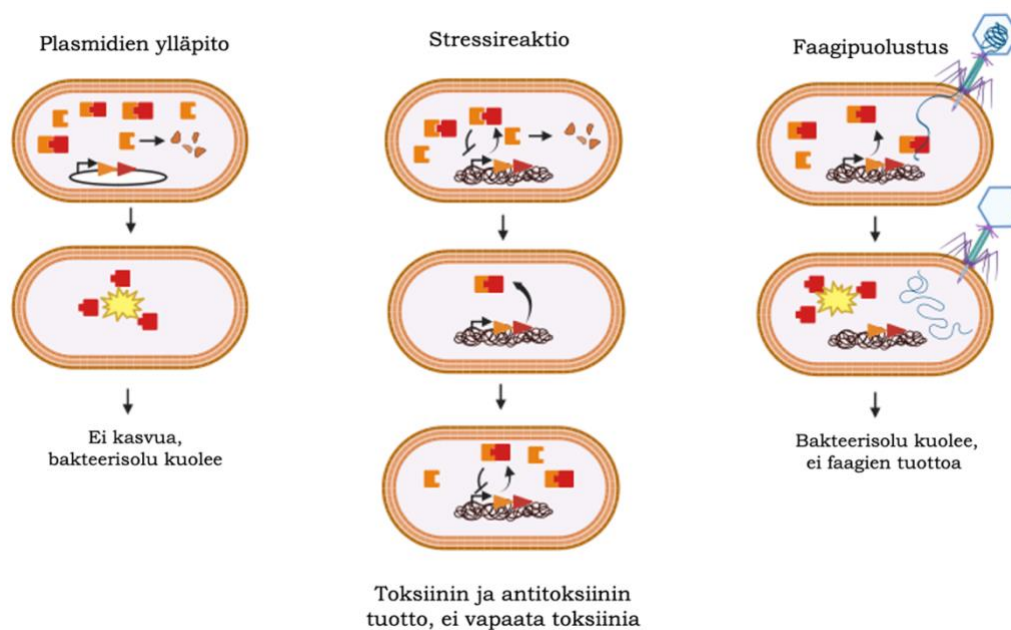
Tyypin IV, V ja VI toksiini-antitoksiinijärjestelmien toksiinit ja antitoksiinit ovat proteiineja. Tyypin IV järjestelmissä antitoksiinit eivät suoraan vuorovaikuta toksiinien kanssa, vaan ne liittyvät vastintoksiininsa vaikutuskohteeseen ja estävät toksiinin sitoutumisen ja vaikutuksen aikaansaamisen. Tyypin IV toksiini-antitoksiinijärjestelmiä ovat esimerkiksi *CbeA/CbtA* (myös tunnettu nimellä *YeeU/YeeV*), *AbiEi/AbiEii* ja *PygA/PygT*. Tyypin V ja VI toksiini-antitoksiineista ainoat tunnetut esimerkit ovat *GhoT/GhoS* ja *SocA/SocB*. *GhoT* vaurioittaa bakteerisolun lipidikalvoja ja aiheuttaa niihin reikien muodostumista ja lisää solun sinnikkyyttä. *GhoS* on RNAasi, joka hajottaa *GhoT*-toksiinin

lähetti-RNA:n. SocA/SocB järjestelmästä SocB vuorovaikuttaa β -kouran (engl. β clamp) kanssa ja estää replikaatiota. (6)

Tyyppin VII ja VIII toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat viimeisimmät kuvatut toksiini-antitoksiinijärjestelmät. Tyyppin VII toksiini-antitoksiinijärjestelmässä sekä toksiini että antitoksiini ovat proteiineja. Antitoksiinit ovat entsyymejä, jotka neutraloivat vastintoksiininsa geeninluennan jälkeisillä muutoksilla. Tyyppin VII toksiini-antitoksiinijärjestelmiin on varmuudella määritelty kuuluviksi kolme eri järjestelmää: Hha/TomB, TglT/TakA (MenT₃/MenA₃) ja HepT/MntA. Osa näistä järjestelmistä on happiherkkiä ja niiden vaikutukset perustuvat happiherkkyyden vaikutuksiin, kun taas osa on RNAaseja. Tyyppin VIII järjestelmissä sekä toksiinit että antitoksiinit ovat RNA:ta. Yksi tämän tyyppin järjestelmistä on CreT/CreA, jossa toksiinin vaikutus on bakteriostaattinen. (6)

2.2 Toksiini-antitoksiinijärjestelmien toiminta ja merkitys bakteerisolussa

Ensimmäinen löydös toksiini-antitoksiinijärjestelmien merkityksestä oli bakteerisolun jakautumisen jälkeinen tappo, jossa toksiini-antitoksiinikompleksi aiheuttaa isäntäsolun tapon, jos tietty plasmidikopio ei ole siirtynyt siihen jakautumisen yhteydessä. Isäntäsolun selviytyminen on riippuvainen toksiini-antitoksiinigeenien läsnäolosta (Kuva 3.). Ilmiötä kutustaan plasmidiriippuvuudeksi. Ensimmäiset tarkasti kuvatut toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat tyyppin I *hok/sok* ja tyyppin II *CcdA/CcdB*. *hok/sok*-järjestelmän Hok-toksiini aiheuttaa solujen muuttumisen haamusoluiksi, jolloin solukalvo on syystä tai toisesta normaalitilaa läpäisevämpi. *CcdA/CcdB* taas koostuu *CcdB*-toksiinista ja *CcdA*-antitoksiinista, joista *CcdB* aiheuttaa solujen morfologisen muutoksen ja SOS-järjestelmän aktivoitumisen. Molemmissa tapauksissa bakteerisolun jakautumisen jälkeinen tappo ilmiönä riippuu toksiinin ja antitoksiinin erilaisesta stabiilisuudesta. Toksiini on yleensä vakaa proteiini, kun taas antitoksiini on epävakaa proteiini tai RNA. Jos haluttu plasmidi ei ole siirtynyt soluun, toksiinin ja antitoksiinin tuotto loppuu, epävakaa antitoksiini hajoaa, jolloin jäljelle jäänyt toksiini pääsee vapautumaan toksiini-antitoksiinikompleksista ja isäntäsolu kuolee toksiinin vaikutuksesta. Plasmidien lisäksi toksiini-antitoksiinijärjestelmiä koodaavia alueita sijaitsee myös bakteerien kromosomeissa, joissa niitä koodaavat alueet ovat yleensä laajempia genomien alueita tai yksittäisiä genomisia saarekkeita. Kromosomaaliset toksiini-antitoksiinijärjestelmät voivat suojella soluja jakautumisen jälkeiseltä tapolta neutraloimalla plasmidiperäisiä toksiineja ja estämällä isäntäsolun kuoleman, vaikka jokin plasmidi ei olisi solulle periytynyt. Tätä kutsutaan anti-plasmidiriippuvuudeksi (engl. anti-plasmidaddiction). (3)



Kuva 3. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien merkitys bakteerisolussa. Toksiini-antitoksiinijärjestelmät osallistuvat bakteerisolussa plasmidien ylläpitoon, stressireaktioon ja faagipuolustukseen. Myös muita toimintamekanismeja on esitetty, mutta niiden olemassaolosta ja merkityksestä on eriäviä mielipiteitä.

Vaikka plasmidiriippuvuus oli ensimmäinen löydetty toksiini-antitoksiinijärjestelmien toimintamekanismi, se ei kuitenkaan ole toksiini-antitoksiinijärjestelmien yleisin toimintamekanismi bakteereissa. Ajatellaan, että suurin osa toksiini-antitoksiinijärjestelmistä osallistuu bakteerien stressireaktioon, sillä toksiini-antitoksiinikompleksien transkriptio lisääntyy merkittävästi bakteerille epäsuotuisissa oloissa. Erityisesti tyypin II toksiini-antitoksiinien tutkimuksessa on todettu transkription lisääntyvän jopa kymmenkertaiseksi kuitenkin ilman, että järjestelmästä vapautuu toksiinia. Tietynlaiset stressitilanteet saattavat nopeuttaa antitoksiinien hajoamista, mutta tätä kompensoidaan kasvattamalla transkription määrää, jolloin estetään vapaan toksiinin ilmentyminen (Kuva 3.). (5)

Osa toksiini-antitoksiinijärjestelmistä toimii myös solujen puolustuksessa bakteriofageja vastaan. Kun bakteriofagi infektoi bakteerisolun, aktiivinen toksiini vapautetaan toksiini-antitoksiinikompleksista ja isäntäsolu kuolee toksiinin vaikutuksesta. Tämä estää bakteriofagin replikaation bakteerisolussa ja estää uusien faagien tuoton. Infektoituneen solun tappo säästää ympäröivät bakteerisolut bakteriofagien hyökkäykseltä (Kuva 3.). (5)

On myös ehdotettu, että toksiini-antitoksiinijärjestelmät edesauttaisivat niin kutsuttujen antibioottia vastustavien solujen muodostumista (engl. antibiotic persister cells). Tällaiset solut pystyvät sietämään hetkellisesti antibioottien läsnäoloa ilman periytynyttä antibioottiresistenttiyttä. Havaittu antibioottien

lisääntynyt sieto johtuu lähinnä suuresta määrästä toksiini-antitoksiinikomplekseja solussa, mikä aiheuttaa solun kasvun inhibition, jolloin kasvaviin soluihin kohdentuvat antibiootit eivät tehoa yhtä tehokkaasti. Antibioottien sieto ei siis suoranaisesti johtuisi toksiini-antitoksiinijärjestelmän aiheuttamasta suorasta vaikutuksesta. Tätä teoriaa antibioottien siedosta pidetään kuitenkin epävarmana, sillä kaikkia tutkimuksia ei ole pystytty toistamaan tulosten vahvistamiseksi, mutta muutamat tutkimukset myös tukevat tätä teoriaa esimerkiksi villityypin bakteerikannoissa. (5)

2.3 Toksiini-antitoksiinijärjestelmien säätely bakteerisoluisissa

Toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat tarkkaan säädelyjä, jotta homeostaattinen neutraali tila saadaan ylläpidettyä. Tämä tarkoittaa tavallisesti sitä, että antitoksiinia on ylimääri toksiinin määrään verrattuna. Useita säätelymekanismeja on kuvattu jokaisella toksiini-antitoksiinijärjestelmien ilmentymistasolla. Nämä järjestelmät ovat tarkkaan säädelyjä, sillä säätelyn epäonnistuminen on isäntäbakteerille haitaksi ja voi aiheuttaa sen kuoleman. (3)

Suuri osa (erityisesti tyyppin II) toksiini-antitoksiinijärjestelmistä on koodattu genomiin niin, että antitoksiini tuotetaan ennen toksiinia. Toksiinin ja antitoksiinin avoimet lukekehukset menevät hieman toistensa päälle tai ne ovat muutaman emäksen väleillä toisistaan. Tällä tavoin varmistetaan, että antitoksiini on valmiina muodostamaan kompleksin heti toksiinin translaation jälkeen. Tyyppin III toksiini-antitoksiinijärjestelmissä tuottojärjestys on usein sama kuin tyyppillä II, vaikka tyyppin III järjestelmät koostuvat RNA:sta. Lukekehysten sijainnissa toisiinsa nähden saattaa olla myös eroja. Kuitenkin useita tyyppin II toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on kuvattu, joissa toksiinia tuottava geeni edeltää antitoksiinia tuottavaa geeniä. Tällaisen geenijärjestyksen omaavilla genomeilla on havaittu olevan promoottoreita ennen antioksiinigeeniä, jotka edistävät antitoksiinien tuottoa. (3)

Geenien tuottojärjestyksen lisäksi myös toksiini-antitoksiinikompleksit itsessään toimivat oman tuottonsa säätelijöinä (engl. autoregulation). Erityisesti tyyppin II operoneissa tällaista itsesäätelyä on havaittu tapahtuvan. Tyyppin II antitoksiineissa on tyyppillisesti DNA:ta sitova alayksikkö, joka tunnistaa ja kiinnittyy tiettyihin toksiini-antitoksiinin promoottorin osiin sekä luontaisesti epäjärjestynyt alayksikkö, joka laskostuu antitoksiinin kiinnittyessä toksiiniin. Monissa tyyppin II järjestelmissä transkription vähentyminen liittyy toksiinin neutraloimiseen. Sellaisissa systeemeissä riippuen toksiinien ja antitoksiinien määrän suhteesta, muodostuu erilaisia komplekseja, joilla on erilainen affiniteetti geenin operaattorialueelle. Kun toksiinit ovat saturoituneet, on muodostuneiden kompleksien affiniteetti promoottoriin heikko. Kun taas toksiinin määrä on ylittämässä antitoksiinin määrän, näiden kompleksien vaikutusta vähennetään, mikä mahdollistaa uusien antitoksiinien *de novo* transkription ja translaation. Näissä järjestelmissä antitoksiinilla on toksiinin neutraloimisen lisäksi myös

säätelytehtävä. Kyseessä on negatiivinen palautesäätely, jota kutsutaan myös ehdolliseksi yhteistoiminnaksi (engl. conditional cooperativity), joka varmistaa tarkan homeostaattisen tasapainon ylläpidon, jossa toksiini ei vahingossa pääse vapautumaan kompleksista. Tämä ilmiö ei kuitenkaan päde kaikille tyyppin II järjestelmille ja esimerkiksi osassa järjestelmistä antitoksiini muodostaa neutraloivia rakenteita ilman toksiinin läsnäoloa. On myös useita esimerkkejä tyyppin II järjestelmistä, joissa transkriptionaalinen säätely on kolmannen kokonaan järjestelmän ulkopuolisen komponentin vastuulla. Tätä ja geenien tuottojärjestystä säätelymekanismina kutsutaan transkriptionaaliseksi autoregulaatioksi, joka on yksi kolmesta toksiini-antitoksiinijärjestelmien tärkeimmistä säätelymekanismien kategoriasta. (3,10)

Toinen tärkeä kategoria on transkription jälkeinen säätely, joka perustuu toksiineille komplementaarisiin RNA-antitoksiineihin ja niiden aikaansaamaan säätelyyn. Tyyppin I järjestelmissä RNA-antitoksiinit ovat koodattu vastakkaisessa juosteessa verrattuna toksiinia koodaavaan geeniin. Esimerkiksi *hok/sok*-järjestelmässä tapahtuu monimutkainen säätelyketju, jossa RNA:ta ja sekundaarirakenteita muovataan ja ribosomit muodostavat eräänlaisen valmiustilan (engl. standby site) ylävirtaan toksiinia koodaavan geenin ribosomia sitovasta kohdasta. Kun antitoksiinia ei ole, ribosomin 30S alayksikkö kiinnittyy ylävirtaan toksiinia koodaavan geenin ribosomia sitovasta paikasta, jolloin toksiinin translaatio käynnistyy. Tyyppin I RNA-antitoksiinit kilpailevat ribosomin kanssa ribosomia sitovaan alueeseen kiinnittymisestä ja muodostunut toksiini-antitoksiini RNA-kaksoisyksiköt voidaan hajottaa RNAasi III:lla toksiinin hajottamiseksi. RNA-antitoksiinien on osoitettu olevan heikompia kuin tuotetut vastintoksiinit, joka mahdollistaa toksiinin tuoton silloin, kun antitoksiinia ei ole tuotettu. Tyyppin II järjestelmissä transkription jälkeinen säätely ilmenee esimerkiksi siten, että toksiinien translaatio on huomattavasti heikompaa kuin antitoksiinien, joka mahdollistaa antitoksiinin ylimäärän toksiiniin verrattuna ja varmistaa siten täydellisen neutralisaation. Tyyppin III järjestelmissä transkription jälkeinen RNA-antitoksiinien kypsyminen on edellytys toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumiselle. RNA-antitoksiinit koostuvat toistuvista sekvensseistä ja translaation jälkeen endoribonukleasitoksiini pilkkoo ja muovaa RNA-antitoksiinin sekvenssin oikeanlaiseksi, jolloin RNA-antitoksiini saa oikeanlaisen rakenteen ja pystyy neutraloimaan toksiinin. (3)

Kolmas ja viimeinen säätelymekanismien pääluokka on translaation jälkeinen säätely, joka perustuu erityisesti tyyppin II ja III järjestelmillä antitoksiinin ja toksiinin muodostamaan kompleksin ja sen avulla toksiinin neutraloimiseen. Se, millä mekanismeilla toksiini neutralisoituu vaihtelee eri tyyppien välillä. Näitä mekanismeja ovat esimerkiksi toksiinin katalyyttisen alueen tukkiminen, steerisen esteen muodostaminen toksiinin ja sen substraatin välille, sekundäärirakenteiden häiritseminen tai aktiivisten toksiinidimeerien muodostumisen estäminen. On kauan sitten jo havaittu, että monen tyyppin II järjestelmien antitoksiinit ovat huomattavasti epävakaita verrattuna niiden vastintoksiineihin. Tämä perustuu todennäköisesti antitoksiinien sisäisiin epäjärjestyneisiin alayksiköihin (engl. intrinsic

disordered domain), joita ATP-riippuvaliset proteaasit tunnistavat ja hajottavat. On kuitenkin havaittu sekä *in vivo* ja *in vitro*, että antitoksiinit ovat vakaampia, kun ne ovat muodostaneet kompleksin toksiinin kanssa. On pitkään ajateltu, että stressiä lisäävät olosuhteet vaikuttavat antitoksiinien kestävyyskykyyn, mutta viime aikoina muutamat tutkimukset ovat havainneet, että asia ei välttämättä olekaan näin ja stressi ei vaikuttaisi ainakaan kaikissa järjestelmissä antitoksiinien kestävyyskykyyn. (3)

Joissain tyyppin II järjestelmissä on havaittu kolmas järjestelmään osallinen geeni, joka koodaa kaperonia eli polypeptidiketjuihin sitoutuvaa proteiinia, jolla on monia eri tehtäviä. Kyseisissä järjestelmissä kaperoneita tarvitaan antitoksiinin oikeanlaiseen laskostumiseen, joka estää antitoksiinin hajotuksen ATP-riippuvaisten proteaasien vaikutuksesta. Jos kaperoneita ei ole, antitoksiinit eivät laskostu oikein ja ne kasaantuvat (engl. aggregation), jolloin ne eivät pysty neutraloimaan toksiineja. Osalla tyyppin II järjestelmien toksiineista on havaittu aktiivisuuden aikaansaaminen post-translationalisilla muutoksilla kohteeseensa. Näillä samoilla toksiineilla on havaittu itsemuokkausta (engl. self-modify), jolla ne saavat aikaan oman aktiivisuutensa inaktivoitumisen. Tämän mekanismin varsinaista merkitystä bakteerisoluille ei ole kuitenkaan vielä saatu selville. (3)

Tyyppin VII järjestelmissä antitoksiinit ovat entsyymejä, jotka inhiboivat vastintoksiininsa post-translationalisilla muutoksilla tietyissä aminohappotähteissä. Neutralisointi voi tapahtua toksiinin fosforylaatiolla, AMPylaatiolla tai oksidaatiolla. (3)

2.4 Toksiinien vaikutukset bakteerisolussa

Toksiinit ovat proteiineja, peptidejä tai RNA-molekyylejä, jotka ovat aktiivisia bakteerin solulimassa tai solukalvon sisäpinnalla. Toksiineilla on monta mahdollista tapaa vaikuttaa bakteerisolun toimintaan ja elinvoimaan. Toksiinit voivat esimerkiksi heikentää DNA:ta tai haitata sen replikaatiota. Tämä voi tapahtua esimerkiksi inhiboimalla DNA:n uudelleenkiinnittymistä DNA-gyraasin katalyyttisessä toimintakierrossa, jolloin DNA jää niin kutsuttuun pilkottuun muotoon. Seurauksena tästä replikaatiohaarukat luhistuvat ja kaksoisjuoste hajoaa, jolloin SOS-vaste aktivoituu ja bakteerisolu kuolee. Toksiinit voivat myös AMPyloidia eli kiinnittää adenosinimonofosfaatin kovalenttisesti DNA-gyraasin tai topoisomeraasi IV:n N-terminaalisen päähän, mikä estää niiden ATP:n hyödyntämisen energianlähteenä ja siten inhiboi DNA dekatenaatiota (engl. decatenation) eli DNA-renkaan katkaisua ja replikaatiota. Jotkin toksiinit voivat kohdentua suoraan bakteerin DNA:han ja aiheuttaa siihen vaurion, jolloin SOS-vaste aktivoituu. Toksiini voi myös vuorovaikuttaa DNA-polymeraasin β -kouran kanssa ja haitata DNA:n replikaatiota. (3)

Proteiinisynteesiin vaikuttaminen on tyypin II toksiinien päävaikutusmekanismi. Monet näistä toksiineista ovat RNAaseja, jotka hajottavat RNA:ta ja siten vaikuttavat proteiinisynteesiin. Eri toksiineilla on eriasteinen spesifisyys, joka tarkoittaa, että ne hajottavat erilaisia RNA-molekyylejä. Jotkut hajottavat esimerkiksi lähetti-RNA:ta ja ribosomaalista RNA:ta ja toiset taas vain tiettyä siirtäjä-RNA-molekyylä. Toksiinit voivat esimerkiksi kiinnittyä translatoivaan ribosomiin translaation aikana ja pilkkoa lähetti-RNA:n. Monet toksiinit vaikuttavat siirtäjä-RNA-molekyyleihin translaation jälkeisillä muutoksilla. Ne voivat esimerkiksi fosforylroida tai asetyloida RNA:n tai sen toimintaan vaikuttavan molekyylin tai liittää niihin erilaisia molekyyylejä kuten pyrimidiiniin tai pyrofosfaatin. Äskettäin löydetty tyypin VIII CreT toksiini voi jopa estää tiettyjen siirtäjä-RNA-molekyylien toimintaa ja keskeyttää bakteerin kasvun. (3)

Toksiinit voivat heikentää bakteerien solukalvoa ja solun tukirangan (engl. cytoskeleton) yhtenäisyyttä. Monet kooltaan pienet toksiinit aiheuttavat solukalvon depolarisaatiota ja protonivoimaa (engl. proton motive force) solun sisäkalvoon liittymisen seurauksena. Ne myös voivat häiritä solunjakautumista käynnistämällä nukleoidien kondensoitumisen. Nämä pienet yksittäisistä heliksistä koostuvat transmembraaniset peptidit kuuluvat tyypillisesti tyyppiin I. Kahdesta heliksistä koostuvien transmembraanisten proteiinien yli-ilmentyminen saa aikaa haamusolujen muodostumisen. Toksiinit voivat vaikuttaa solukalvon ehjyyteen myös fosforyloimalla uridiinidifosfaattiglukoosia, joka osallistuu useisiin sokeriaineenvaihdunnan reaktioihin ja siten vaikuttaa peptidoglykaanien ja lipopolysakkardien biosynteesiin. Jotkin toksiinit inhiboivat solunjakautumista estämällä MreB ja FtsZ -proteiinien polymerisaatiota suoraan vuorovaikuttamalla niiden kanssa. MreB vastaa toiminnaltaan tumallisten solujen aktiinia ja FtsZ tubuliinia, jotka osallistuvat solun tukirangan ylläpitoon. (3)

Hiljattain kuvatut toksiinit voivat hajottaa tai syntetisoida pieniä metaboliitteja, jotka saavat aikaan metabolisen stressin ja inhiboivat bakteerisolun solunsisäisiä toimintoja. Tällainen toksiini on esimerkiksi tyypin II MbcT-toksiini, joka hydrolysoi ja vahingoittaa NAD^+ -molekyylä, jolloin sen toiminta heikkenee. Jotkin tällä tavalla vaikuttavat toksiinit saavat vaikutuksensa aikaan myös esimerkiksi pyrofosforylaariolla. (3)

3 Prekliinisen vaiheen lääkekehitystutkimukset

Prekliinisten lääkekehitystutkimusten yhtenä perusajatuksena on estää Toksiiniin ja antitoksiiniin kiinnittyminen toisiinsa ja siten kompleksin muodostuminen, jolloin Toksiini jää vapaaksi ja tappaa bakteerisolun (Kuva 4.). Tällä tavoin aikaansaatu lääkevaikutus on kohdennettu, jolloin se siis kohdentuu vain haluttuihin bakteereihin ja säästää elimistön muut bakteerit, joista osa on ihmisen elimistön toiminnalle hyödyllisiä. Lääkekehitystutkimusta Toksiini-antitoksiinijärjestelmille on tehty jo pitkään, mutta yhtäkään lääkettä ei ole vielä kliinisessä vaiheessa. Prekliinistä tutkimusta tehdään kuitenkin paljon. Seuraavissa kappaleissa esitellään Toksiini-antitoksiinijärjestelmiä, jotka tällä hetkellä ovat prekliinisen vaiheen lääkekehitystutkimuksen kohteina. Esitellyistä Toksiini-antitoksiinijärjestelmistä kaikki paitsi CreTA kuuluvat tyyppin II järjestelmiin. Tyyppi II on eniten tutkittu Toksiini-antitoksiinijärjestelmien luokka ja siihen kuuluvista järjestelmistä tiedetään eniten, joten iso osa lääkekehitystutkimuksista on kohdennettu tyyppin II järjestelmiin.



Created with BioRender.com

Kuva 4. Toksiini-antitoksiinijärjestelmien yleistetty toimintaperiaate lääkekehityskohteena. Lääkekehityksen perusideana on, että lääkemolekyylillä pystyy estämään Toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen asettamalla näiden kahden väliin (esitetty kuvassa vihreällä tähdellä). Vaikutus voi olla myös esimerkiksi allosteerinen.

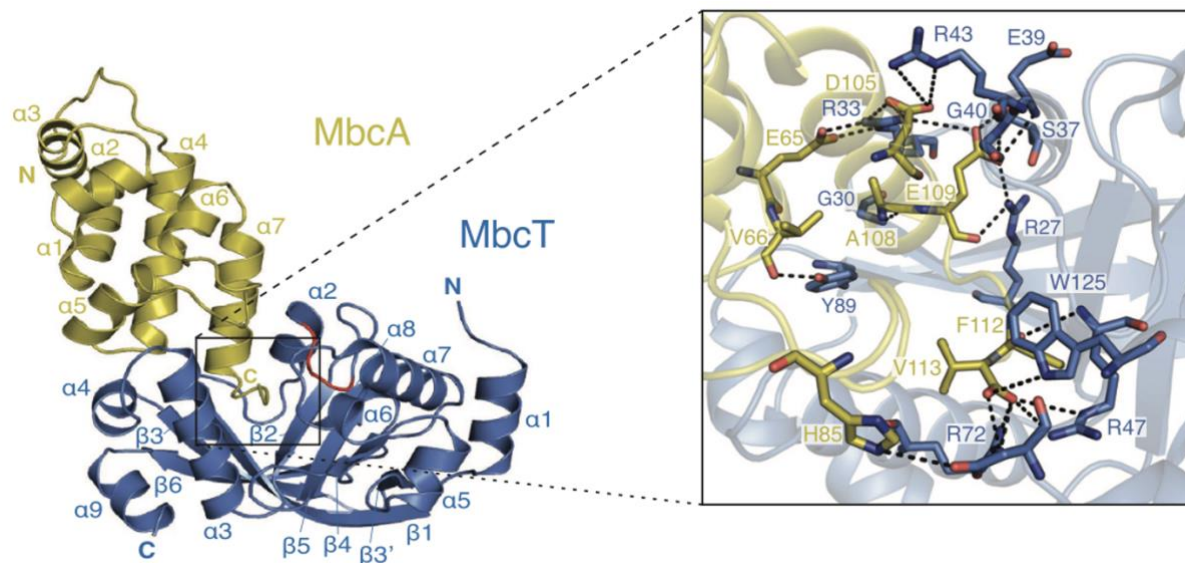
3.1 MbcTA Toksiini-antitoksiinijärjestelmä

Mycobacterium tuberculosis on maailmanlaajuisesti merkittävä, ihmisten terveyttä uhkaava tuberkuloosia aiheuttava bakteeri, joka aiheuttaa vuosittain miljoonia sairaustapauksia ja esimerkiksi vuonna 2018 tuberkuloosiin kuoli 1,5 miljoonaa ihmistä. Yhä useammat sairastapaukset johtuvat antibiooteille resistentistä *Mycobacterium tuberculosis* -kannoista, jonka vuoksi tuberkuloosiin

tarvitaan antibioottien lisäksi uusia lääkkeitä. (11) Tähän mennessä MbcTA toksii-antitoksiinijärjestelmästä on julkaistu kaksi tutkimusartikkelia, jotka kuvaavat sen ominaisuuksia ja mahdollisuuksia lääkekehityskohteena (8,11).

Mycobacterium tuberculosis -bakteerin genomista on löydetty yli 80 erilaista toksii-antitoksiinijärjestelmää, joiden ajatellaan osallistuvan sen patogeenisyyteen ja kestävyteen (engl. persistence). Näistä järjestelmistä kolmen antitoksiinit ovat essentiaaleja *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin elinvoimaisuuteen, jolloin niiden vastintoksiinien voidaan ajatella olevan letaaleja *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerille. Näistä järjestelmistä yksi on Rv989c-Rv1990c eli MbcTA (mycobacterial cidal toxin (MbcT) and antioxin (MbcA)), joka on tyypin II toksii-antitoksiinijärjestelmä eli sekä toksiiini että antitoksiini ovat proteiineja. Kyseinen järjestelmä tunnistettiin ensimmäisen kerran *in silico*. MbcT:n aktiivisen keskuksen oli ennustettu sisältävän kolme konservoitunutta polaarista R-E-S ryhmää eli Arg47, Glu69 ja Ser126. MbcTA järjestelmä on siis jo aiemmin kuvattu, mutta sen toimintamekanismia ja merkitystä bakteereissa ei ole tiedetty. Sen määrän oli kuitenkin havaittu kasvavan stressiä lisäävissä tilanteissa, kuten hapettomissa olosuhteissa ja ravintostarvaatiossa. MbcTA:ta on havaittu myös muilla mykobakteerisilla lajeilla ja sen lisäksi ympäristön bakteereissa, joista niiden on ajateltu joskus siirtyneen mykobakteerisille bakteerilajeille. (8)

MbcTA:n hyödyntäminen lääkekehityskohteena edellyttää sen toimintamekanismin tuntemista ja todentamista, että MbcT todella on bakterisidinen eli bakteerin tappava. Sen ilmentymistä, toimintaa ja määriä tutkittiin erilaisilla promootoreilla, vektoreilla ja bakteereilla monenlaisissa olosuhteissa, joiden avulla osoitettiin MbcTA:n olevan bakterisidinen. MbcTA:n tarkka kiderakenne on selvitetty (Kuva 5.) ja sitä verrattiin muiden molekyylien kiderakenteisiin, jotta saataisiin selville MbcTA:n toimintamekanismi. Kiderakenteen tunteminen mahdollistaa potentiaalisten lääkemolekyylien etsinnän myöhemmin lääkekehitysprosessissa. MbcT:n rakenteessa havaittiin samankaltaisuutta ART-ribosyltransferaasientsyymeihin, joiden tehtävänä on NAD⁺:ien siirto molekyylien välillä ja NADaasien eli NAD⁺:n glykohydrolaasien kanssa, mutta rakenteessa oli kuitenkin eroja. Tästä pääteltiin, että MbcT:n toksisuuteen liittyy NAD⁺, mutta sen toimintamekanismi on erilainen kuin ART-ribosyltransferaasientsyymien ja NADaasien. MbcT:n toimintamekanismin selvittämiseksi villityypin toksiiinia eristettiin ja sen toimintaa tutkittiin inkuboimalla rekombinanttiproteiinia eri bakteerisolun osasten kanssa (engl. cell fraction). Sen toimintaa seurattiin ja tutkimuksessa havaittiin lisääntynyt NAD⁺ hajoaminen, ADP-riboosin tuotto ja ADP-riboosi-1^{''}-fosfaatin ilmentyminen, jonka määrä riippui MbcT:n määrästä. Näistä tuloksista pääteltiin MbcT:n toimivan NAD⁺ fosforylaasina ja useiden lisätutkimusten avulla sen todettiin olevan MbcT:n toksisuuden lähde. (8)



Kuva 5. MbcTA:n kiderakenne *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerista. Kuvassa sinisellä on esitetty MbcT-toksiini ja keltaisella MbcA-antitoksiini. Toksiinin ja antitoksiinin sitoutumiskohdan muodostavat aminohapot on esitetty oikealla. Kuva lähteestä (8).

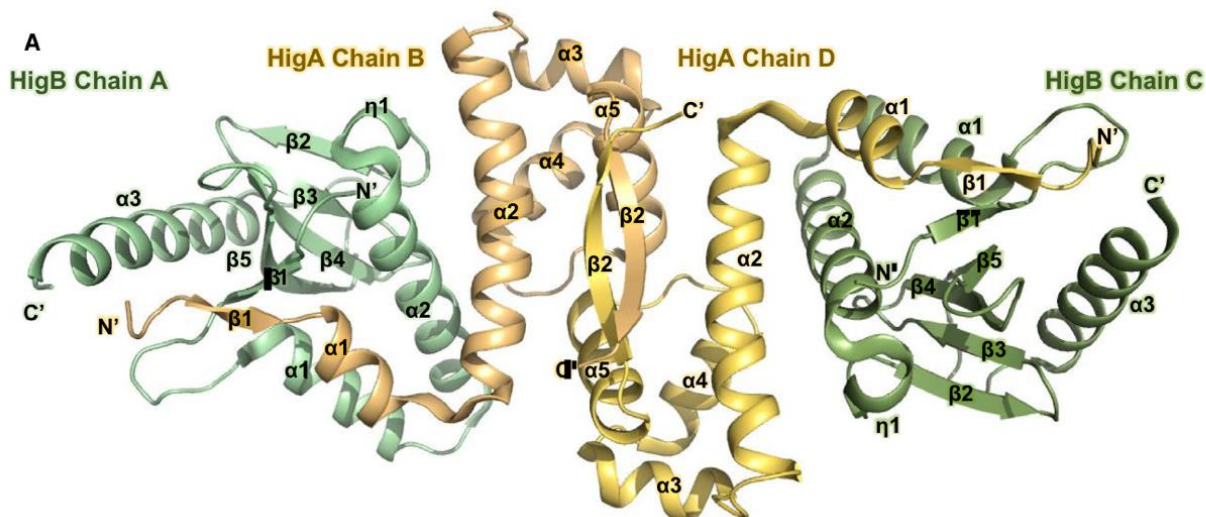
MbcT:n ilmentäminen *Mycobacterium tuberculosis* -bakteereissa vähensi kyseisten bakteerien määrää *in vitro*. MbcT:n toksisuutta *Mycobacterium tuberculosis* -bakteereille tutkittiin myös *in vivo* doksisykliinillä indusoitavan promoottorin alla ja havaittiin, että MbcT-indusoidut immuunipuutteiset SCID hiiret elivät 40 % pidempään tuberkuloosi-infektion kanssa kuin kontrollihiiret. Tutkimusta tehtiin myös C57BL/6-hiirillä ja niillä havaittiin samankaltaisia tuloksia eli bakteerimäärän vähentymistä MbcT:n indusoitumisen jälkeen. Tuberkuloosin hoidossa yleisesti käytetyn isoniatsidin ja MbcT:n indusoitumisen kanssa yhdessä havaittiin synergistinen vaikutus, sillä nämä yhdistämällä bakteeritaakka pieneni kymmenkertaisesti verrattuna pelkkään isoniatsidihoitoon. (8)

Edellä mainitut löydökset mahdollistavat molekyyli-inhibiittorien etsinnän, joiden avulla MbcTA-kompleksi voidaan hajottaa tai MbcA-antitoksiinin toimintaa estää. *Mycobacterium tuberculosis* -bakteereihin kohdennettuja molekyyli-inhibiittoreita voitaisiin käyttää hyödyksi tuberkuloosin lääkehoidossa. (11)

3.2 HigBA toksiini-antitoksiinijärjestelmä

Streptococcus pneumoniae on gram-positiivinen bakteeri, joka aiheuttaa ihmisillä monenlaisia hengitystiesairauksia (12,13). *S. pneumoniae* on neljänneksi yleisin kuolemaan johtavien bakteerisairauksien aiheuttaja ja sen aiheuttamia sairastapauksia on vuodessa noin 14,5 miljoonaa, joista suurin osa on Aasiassa tai Afrikassa (12). Vuonna 2019 keuhkokuumeeseen kuoli yli 740 000 lasta ja *S. pneumoniae* on yleisin pneumonian aiheuttaja alle 5-vuotiailla lapsilla (14). *S. pneumoniae* -bakteerin resistenttiys antibiooteille on lisääntynyt jo monen vuosikymmenen ajan ja se on kasvava ongelma (15).

Tähän mennessä *S. pneumoniae* -bakteerista on löydetty seitsemän erilaista tyypin II toksiini-antitoksiinijärjestelmää, joista yksi on HigBA. HigBA järjestelmiä on erilaisia ja niiden välillä HigB toksiinien sekvenssin homologia on rajallista ja HigA-antitoksiinien rakenteiden välillä on merkittävää eroavaisuutta (16–18). *S. pneumoniae* -bakteerin HigBA järjestelmän tarkka rakenne on onnistuttu selvittämään röntgenkristallografialla (7). Järjestelmän rakenteen tarkka tuntemus on tärkeä osa lääkekehitystä, sillä sen avulla kompleksin muodostumisen estäviä lääkeainemolekyylejä on mahdollista etsiä. HigBA-kompleksin rakenne on asymmetrinen heterotrimeeri, jossa HigB-toksiini ja HigA-antitoksiini muodostuvat kummatkin kahdesta heterodimeeristä (Kuva 6.) (7). Rakenteen tutkimuksessa havaittiin, että HigB-toksiinilla on ribonukleasiaktiivisuutta eli se pilkkoo RNA:ta pienemmiksi palasiksi *in vitro* ja sen vaikutus bakteeriin on bakterisidinen (7). Rakenteenanalyysissä havaittiin myös, että HigA-antitoksiini ei sitoudu HigB:n aktiiviseen kohtaan, vaan sen aikaansaama vaikutus on allosterinen eli se sitoutuu muualle toksiiniproteiiniin ja saa siten aikaan sen toiminnan muutoksen ja inhiboitumisen (7). HigBA:n toiminnasta on saatu selville, että HigA säätelee transkriptiota sitoutumalla DNA:han ja siten muokkaamalla sen toimintaa (7). Kuitenkin on myös havaittu, että HigBA kompleksin affinitetti DNA:han on HigA:ta suurempi ja on ehdotettu, että HigBA-kompleksilla on enemmän kuin yksi transkriptionaalinen säätelymekanismi HigA:n säätelytoiminnan lisäksi (7).

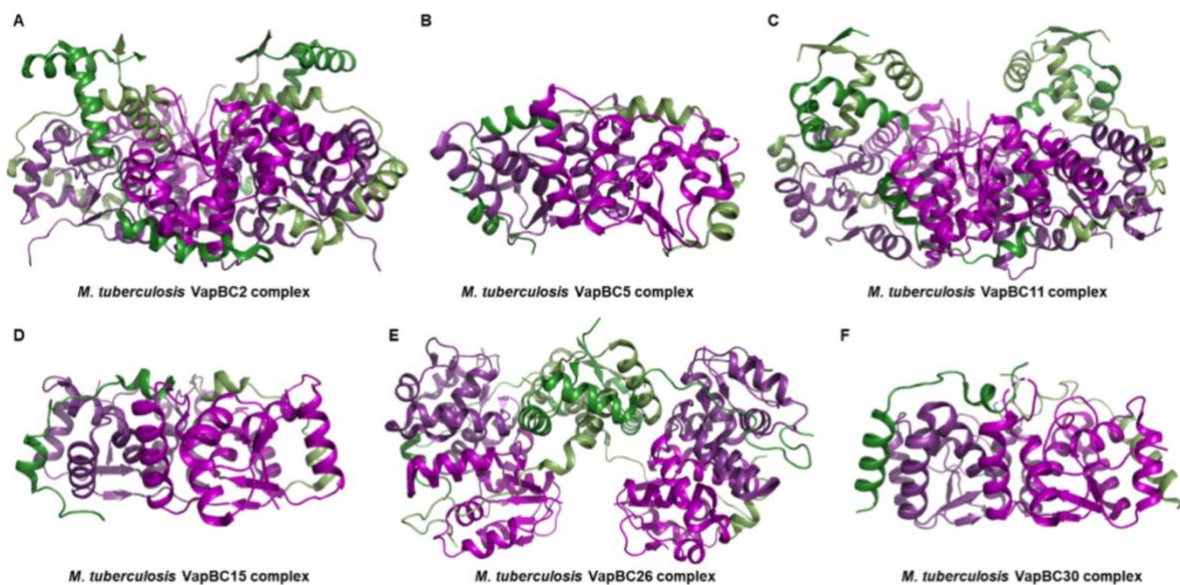


Kuva 6. HigBA:n selvitetty heterotetrameerinen kiderakenne *Streptococcus pneumoniae* -bakteerissa. HigB-toksiinin rakenteet A ja C on esitetty vihreällä ja HigA-antikoksiinin rakenteet B ja D keltaisella. Kuva lähteestä (7).

Samassa tutkimuksessa, jossa *S. pneumoniae* -bakteerin kiderakennetta ja sen ominaisuuksia selvitettiin, tutkittiin myös HigBA:n mahdollisuutta toimia lääkekehityskohteena. Tutkimuksessa kehitettiin peptidejä, jotka HigA:n tapaan sitoutuisivat HigB:hen allosteerisesti ja sitä kautta inhiboisivat sen toksisuuden. Samankaltaisia allosteeriseen säätelyyn viittaavia piirteitä on havaittu HigBA-järjestelmissä myös muissa bakteereissa. Peptidin tarkoituksena olisi estää HigA:n tai HigB:n sitoutumiskohdan saavutettavuus. Tutkimuksessa havaittiin, että yksi pistemutaatio sitoutumisalueella HigBA-kompleksissa ei riitä saamaan aikaan HigB:n toksista vaikutusta. Kuitenkin havaittiin, että sitoutuvaa aluetta matkiva peptidi häiritsi HigBA-kompleksin muodostumisen täysin. Kyseisissä peptideissä oli useita sitoutumisalueen kanssa vuorovaikuttavia osia. *In vivo* havaittiin, että HigBA kiderakenteen perusteella suunnitellut peptidit onnistuivat läpäisemään myös solukalvon ja siirtymään *S. pneumoniae* -bakteerin sisään ja saamaan aikaan kasvua rajoittavan vaikutuksen. Tämä mahdollinen antimikrobiaalinen mekanismi on täysin uusi verrattuna jo olemassa oleviin antibiootteihin. Tutkitut peptidit siis estivät HigBA-kompleksin muodostumisen, jolloin HigB jäi vapaaksi. Kyseisessä tutkimuksessa ei kerrota näiden löydettyjen peptidien rakenteista mitään, mutta se todistaa näiden peptidien voivan toimia antimikrobiaalisesti *S. pneumoniae* -bakteereissa. Tutkimuksessa on erikseen mainittu, että seuraava vaihe olisi parannella löydettyjen peptidien ominaisuuksia, jotta niistä saataisiin tulevaisuudessa antimikrobiaalinen lääkeaine taudinaiheuttajabakteereja vastaan. (7)

3.3 VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmä

VapBC (engl. virulence-associated proteins) toksiini-antitoksiinijärjestelmä on MbcTA tapaan löydetty tuberkuloosia aiheuttavasta *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerista, mutta kyseinen järjestelmä on havaittu myös monissa muissa bakteerilajeissa. VapC-toksiinilla on pilusta liikuttava moottori (engl. Pilus retraction motor) N-terminaaliossa alayksikkössä (engl. domain), jolla on nukleasiaktiivisuutta. VapC siis pilkkoo RNA:ta vaimentaakseen bakteerin metabolista aktivaatiota. VapC:n aktiivinen kohta koostuu happamista tähteistä, jotka tekevät sen aktiivisesta kohdasta negatiivisesti varautuneen, johon voi koordinoitua kahdenarvoisia metalli-ioneja. VapB on antitoksiini, joka inhiboi VapC:n toksisuuden ja sen rakenteessa on kaksi funktionaalista osaa, joista N-terminaalinen osa sitoutuu DNA:n toksiini-antitoksiinijärjestelmää koodaavaan operoniin ja C-terminaalinen osa VapC-toksiiniin mitätöiden sen toksisen vaikutuksen. VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmä kuuluu tyyppiin II ja sekä toksiini että antitoksiini ovat proteiineja. VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmään kuuluu monta erilaista alalajia, joita ovat esimerkiksi VapBC2, VapBC5, VapBC11, VapBC15, VapBC26 ja VapBC30, joiden rakenteet eroavat keskenään (Kuva 7). (19)



Kuva 7. Eri VapBC-järjestelmien kiderakenteita *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerissa. Kuvassa on esitetty VapBC2, VapBC5, VapBC11, VapBC15, VapBC26 ja VapBC30 rakenteet. Kuvissa VapC-toksiinit on esitetty vihreällä ja VapB-antitoksiinit violetilla. Kuva lähteestä (19).

VapBC:stä ja sen mahdollisuuksista lääkekehityskohteena on tehty monia tutkimuksia. Esimerkiksi *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin VapBC26 yksityiskohtainen kiderakenne on pystytty selvittämään ja siihen on onnistuttu kehittämään inhibiittoreita, jotka estävät toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen. VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmät ovat tärkeä

tutkimuskohde *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerissa, sillä VapBC-järjestelmien määrä verrattuna muihin mykobakteereihin on huomattavasti suurempi *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerissa. VapBC26:lla on kolme ominaisuutta, joiden vuoksi se on lupaava lääkekehityskohde: hapettomissa olosuhteissa VapB26:den määrä vaihtelee huomattavasti, mikä viittaisi sen olevan tärkeä bakteerille stressiä aiheuttavissa tilanteissa, VapC26 on ribotoksiini, joka pilkkoo bakteerin normaalin toiminnan kannalta tärkeän SRL-proteiinin (engl. sarcalumenin protein) ja VapC26 toksiinilla on osoitettu saavan aikaan voimakas bakteerien kasvun esto *E. coli* ja *M. smegmatigs* -bakteereissa. VapC26 siis estää kohdesolun kasvua ja inhiboi sen translaatiota. Nämä tekijät yhdessä tekevät VapBC26:sta lupaavan lääkekehityskohteen ja siihen on onnistuttu löytämään VapC26:den kaltaisia peptidejä, jotka estivät VapC26:den ja VapB26:den kompleksin muodostusta jopa 80 % normaalitilaan verrattuna. Toksiinia matkiva peptidi saa aikaan antitoksiinin kiinnittymisen siihen varsinaisen toksiinin sijasta, jolloin toksiinin toksinen vaikutus ei esty. Näiden peptidien ominaisuuksia, kuten solun läpäisevyyttä, pitää kuitenkin vielä kehittää, ennen kuin kyseessä on varsinainen mahdollinen potentiaalinen lääkemolekyyli. (20)

Mycobacterium tuberculosis -bakteerin VapBC30-, VapBC2- ja VapBC21-järjestelmiin on myös yritetty kehittää kohdennettuja lääkkeitä. VapBC30 -järjestelmään on onnistuttu kehittämään inhibiittoreita, jotka estävät toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen. Monissa VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmissä on havaittu antitoksiinin häiritsevän kahdenarvoisia metalli-ionien, kuten Mg^{2+} tai Mn^{2+} , sitoutumista VapC-toksiiniin ja sitä kautta häiritsevän sen toksisuutta. Näin on myös VapBC30 -järjestelmässä. VapBC2 ja VapBC21 rakenteiden perusteella on päätelty, että ne voisivat olla lupaavia lääkekehityskohteita, mutta niihin ei ole onnistuttu kehittämään vielä potentiaalisia inhibiittorimolekyylejä. (21,22)

VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on löydetty myös muista bakteereista. VapBC1 toksiini-antitoksiinijärjestelmä on löydetty *Haemophilus influenzae* -bakteerista, joka aiheuttaa erilaisia hengitystieinfektioita ja keuhkohtaumataudin pahenemista. *Haemophilus influenzae* -bakteerista on nykypäivänä kehittynyt myös resistenttejä kantoja, joiden hoito tämänhetkisin lääkkeillä on haastavaa. VapBC1-järjestelmän käyttö lääkekehityskohteenä eroaa muista tässä työssä esitellyistä toksiini-antitoksiinijärjestelmistä siten, että antitoksiinin sijaan yritetään kehittää inhibiittori toksiinille eli VapC1:lle. Tämä johtuu siitä, että VapC1 saa aikaan *Haemophilus influenzae* -bakteereissa kasvun rajoittumisen tappamatta bakteeria, jolloin bakteeri ei kuole antibiootihoidon aikana, sillä antibioottien teho yleisesti kohdistuu jakautuviin bakteereihin. VapC1:seen kohdistuvia inhibiittoreita on etsitty virtuaalisella seulonnalla etsimällä VapB1 antitoksiinin kaltaisia molekyylejä. Seulonnasta löytyneet osumat (engl. hit) testattiin myös *E. coli* -bakteereilla ja löytyneiden molekyyleiden havaittiin pääsevän bakteerin sisään ja vuorovaikuttavan solun sisäisen kohteen kanssa. Niiden ei kuitenkaan havaittu inhiboivan VapC1-toksiinia tarpeeksi voimakkaasti estääkseen kasvun rajoittumisen yhtä tehokkaasti

kuin VapB1-antitoksiini. Nämä molekyylit kuitenkin tarjoavat lähtökohdan VapC1-inhibiittorien etsinnälle *Haemophilus influenzae* -bakteerin aiheuttamien sairauksien lääkehoitoon. (23)

VapBC toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on myös löydetty *Klebsiella pneumoniae* -bakteerista, joka aiheuttaa verenmyrkytyksiä, ylähengitys- ja virtsateiden infektoita sekä keuhkokuumetta. VapBC on ensimmäinen toksiini-antitoksiinijärjestelmä, joka on löydetty *Klebsiella pneumoniae* -bakteerista. *Klebsiella pneumoniae* -bakteerilla on erityisen helposti muovautuva genomi, joten se muuntuu helposti antibioottiresistentiksi ja se on jo resistentti jopa karbapeneemeille. *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin VapC-toksiinilla on alhainen sekvenssin samankaltaisuus esimerkiksi *Haemophilus influenzae* -bakteerin VapC1 ja *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin VapC26 toksiinien kanssa. *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin VapBC-järjestelmään on myös löydetty kaksi peptidiä, jotka estävät toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumien, jolloin toksiini vapautuu ja sen vaikutus tappaa bakteerin. *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin VapC:n toksisuus perustuu sen RNAasi aktiivisuuteen ja kykyyn pilkkoa RNA:ta. Tässäkin tapauksessa lääkekehitys on sellaisessa vaiheessa, että mahdollisia peptidejä on löydetty, mutta niiden ominaisuuksien kehitys ja parantelu on kesken. (24)

3.4 CreTA toksiini-antitoksiinijärjestelmä

CreTA on toksiini-antitoksiinijärjestelmä, jota CRISPR-Cas kaskadi transkriptionaalisesti säätelee. CRISPR-Cas on bakteerien puolustusmenetelmä viruksia ja muuta vierasta DNA:ta vastaan ja sen toiminta perustuu vieraan DNA:n hajotukseen. CRISPR-Cas:illa on myös haitallisia ominaisuuksia isäntäbakteerille, kuten autoimmunitaetti tai sille hyödyllisten plasmidien tuhoaminen. Nämä haitat voivat useissa tapauksissa johtaa CRISPR-Cas systeemin menetykseen, josta johtuu hyvin hajanainen CRISPR-Cas -elementtien jakautuminen jopa läheisten bakteerisukujen välillä. Bakteerien genomeissa on kuitenkin oletettu olevan mekanismeja, jotka estäisivät CRISPR-Cas geenien häviämisen ja yksi näistä esitetyistä mekanismeista liittyy CreTA toksiini-antitoksiinijärjestelmään. CreTA kuuluu tyyppiin VIII ja molemmat sekä toksiini että antitoksiini ovat RNA:ta. CreT (engl. Cascade-repressed toxin) on bakteriostaattinen RNA, joka hajottaa tiettyä siirtäjä-RNA:ta. CreA taas on CRISPR:in RNA:ta muistuttava RNA, joka tarvitsee Cas6 endoribonukleaasin kypsyäkseen (engl. maturation). CreA:lla ja *creT*-promootorilla on osittainen komplementaarisuus, jonka avulla CreA ohjaa CRISPR-Cas kaskadin estämään toksiinin tuoton. Tämä tarkoittaa, että CreA toimii antitoksiinina vain CRISPR-Cas kaskadin läsnäollessa. Yksinkertaisuudessaan siis CRISPR-Cas kaskadia koodaavat *cas*-geenit ovat essentiaaleja CreT toksiinin tuoton estämiseksi ja koska kyseisten geenien säilyttäminen bakteereissa on erityisen tärkeää, niin silloin myös CRISPR-Cas puolustusmekanismi säilyy bakteereissa. On myös ajateltu, että CRISPR-Cas kaskadiin liittyvät toksiini-antitoksiinijärjestelmät aiheuttaisivat

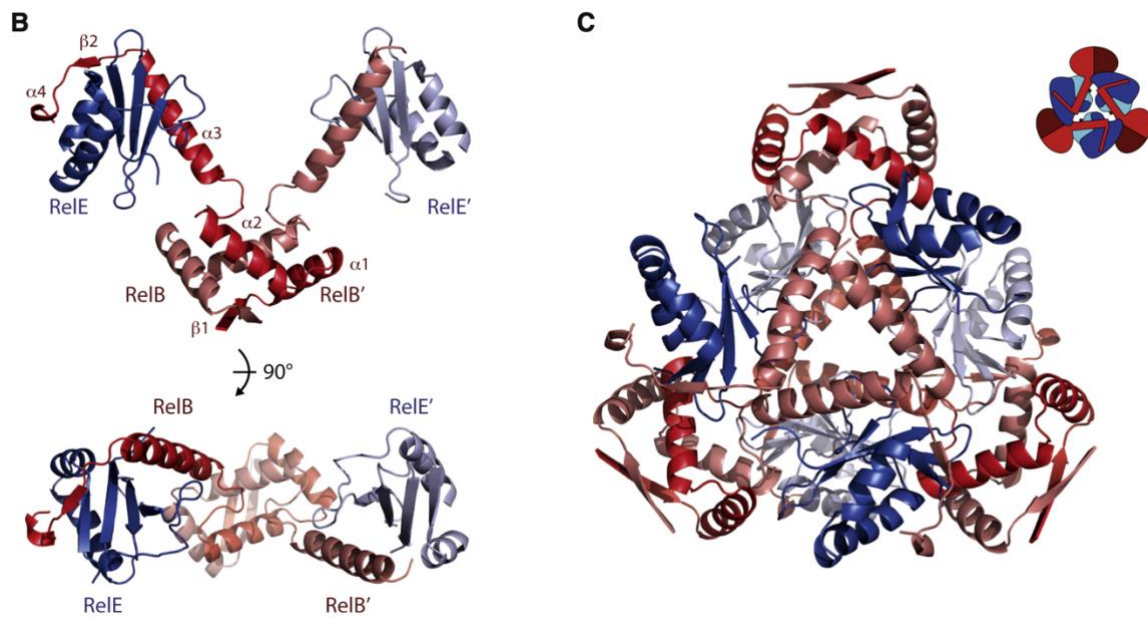
bakteerisolun siirtymisen horrostilaan tai jopa bakteerisolun kuoleman, jos CRISPR-Cas puolustusmenetelmä pettää eikä se pysty suojelemaan bakteerisolua. CreTA oli pitkään tuntematon järjestelmä, mutta sen ominaisuuksien perusteella voidaan olettaa, että sen kaltaisia järjestelmiä on paljon enemmän kuin tähän mennessä on osattu löytää tai ajatella. (25)

CRISPR-Cas järjestelmää voidaan käyttää hyödyksi lääkekehityksessä esimerkiksi ohjaamalla CRISPR-Cas hajottamaan bakteerille hyödyllisiä geenejä, kuten antibioottiresistenssigeenejä. Kyseisessä strategiassa on kuitenkin ongelmana, että vaikka CRISPR-Cas tuhoaisi antibioottiresistenssigeenin bakteereista, yleensä muutama bakteeri jää silti jäljelle, jolloin bakteerien aiheuttama infektio ensin vaikuttaisi paranevan ja sitten paheneekin uudestaan jäljelle jääneiden bakteerien määrän kasvun takia. Tämän vuoksi on kehitetty antimikrobiaalinen strategia ATTACK, joka yhdistää CRISPR-Cas järjestelmän ja CreTA toksiini-antitoksiinijärjestelmän. Tässä strategiassa CRISPR-Cas ensin tuhoaa bakteerin antibioottiresistenssigeenin, jolloin bakteerit tulevat taas herkiksi antibiooteille. Pieni osa bakteereista jää henkiin, koska ne onnistuvat inaktivoimaan CRISPR-Cas effektor-RNA:n, jolloin CreTA vapauttaa CreT toksiinin, joka tappaa jäljelle jääneet bakteerit. CreTA siis tehostaa CRISPR-Cas:in antimikrobiaalista vaikutusta ja saa aikaan tehokkaamman vasteen. Haasteena kuitenkin on, että CreTA on hyvin pieni molekyyli ja sen sekvenssi ei ole konservoitunut ja sen sekvenssin samankaltaisuuden avulla on löydetty vain kaksi samankaltaista molekyyliä. Tällaisten CRISPR-Cas järjestelmän kanssa yhdessä toimivia toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on haastavaa löytää, mutta niitä oletetaan olevan huomattavan paljon enemmän kuin tähän asti on löydetty. Tutkimusta tarvitaan lisää näiden järjestelmien löytämiseksi ja lääkekehityskohteiden löytämiseksi, mutta tähän mennessä tehdyt havainnot CreTA:sta tarjoavat tärkeän pohjan uudenlaisten antimikrobiaalisten lääkkeiden kehitykselle. (26)

3.5 ReIBE toksiini-antitoksiinijärjestelmä

Pseudomonas aeruginosa on bakteeri, joka aiheuttaa vaikeita tulehduksia, joista suurin osa sijoittuu terveydenhuoltoon (27). Sen aiheuttamilla infektioilla on suuri kuolleisuus ja sen aiheuttamia komplikaatioita on esimerkiksi sairaalakeuhkokuumeessa, keuhkohtaumataudissa ja kystisessä fibroosissa (27). *P. aeruginosa* -bakteerin aiheuttamien sairauksien hoidossa suurin haaste on sen resistenssi suurta määrää eri antibiootteja vastaan (28). Sen hoitoon on vuosien saatossa käytetty monia eri antibiootteja, mutta se on muuttunut resistentiksi lähes kaikille niille (28). Jotkut tutkimukset jopa luokittelevat *P. aeruginosa* -bakteerin aiheuttamat sairaudet ei-parannettaviksi (29). *P. aeruginosa* -bakteerin kyky muuntua resistentiksi liittyy vahvasti sen kykyyn tuottaa biofilmiä (30), joka suojaa bakteereja antibioottien tunkeutumiselta bakteerien sisään ja samalla estää niiden altistumista antibiooteille (31). Kuitenkin jos antibiootin pitoisuus kasvaa suureksi, pystyy sitä tunkeutumaan

biofilmin rakenteen sisään, mutta biofilmin sisällä on erilaisia keinoja puolustautua antibiooteilta, kuten efflux-pumput ja inaktivoivat entsyymit (31). Biofilmi suojaa bakteereja niitä ympäröivältä ympäristöltä luoden niille turvallisen nichen kasvaa, mikä johtaa usein krooniseen infekioon (30). Useat tutkimukset ovat osoittaneet tyypin II RelBE toksiini-antitoksiinijärjestelmän osallistuvan eri bakteerien biofilmin muodostukseen ja kyseinen järjestelmä on löydetty myös *P. aeruginosa* -bakteerista (30). RelBE:n kiderakenne on onnistuttu selvittämään *E. coli* -bakteereissa (Kuva 8.) (32).



Kuva 8. relBE:n selvitetty heterotetrameerinen kiderakenne *Escherichia coli* -bakteerissa. Kuvaan on nimetty erikseen jokainen ketju. Kuva lähteestä (32).

Koska aikaisempien tutkimusten perusteella oli tiedossa RelBE:n rooli biofilmin synnyssä ja RelBE löydettiin *P. aeruginosa* -bakteerista, haluttiin RelBE:n roolia tutkia *P. aeruginosa* -bakteereissa, koska biofilmin muodostuksen tiedettiin olevan tärkeää *P. aeruginosa* -bakteerin patogeenisyyden kannalta. RelBE löydettiin kaikista biofilmiä tuottavista *P. aeruginosa* -bakteerin isolaateista. Tutkimuksen aikana havaittiin, että osassa isolaateista havaittiin *relBE*:tä, vaikka niillä ei ollut biofilmien tuottoa. Geenin tuottamaa proteiinia ei kuitenkaan havaittu, joten oletettiin *relBE:n* olevan hiljennetty sellaisissa isolaateissa, joissa biofilmiä ei tuoteta. Tutkimuksessa havaittiin, että mitä enemmän biofilmiä tuotettiin, sen suurempi oli *relBE:n* ilmentyminen. *relBE* myös yhdessä tutkimuksen vaiheessa poistettiin kokonaan genomista, jolloin biofilmin tuotto loppui lähes kokonaan. Tämä löydös ei kuitenkaan ollut täysin yksiselitteinen, sillä kontrolliryhmässä havaittiin samankaltaisia tuloksia, mikä on kyseisen

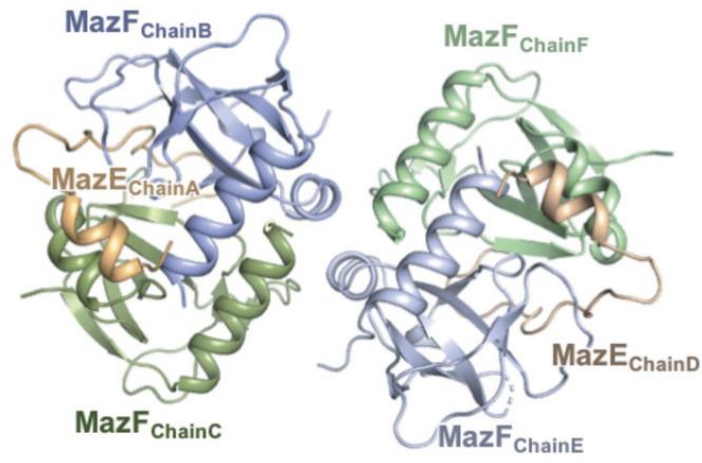
tutkimuksen tekijöiden myöntämä tutkimuksen heikkous. Kuitenkin villityypin kantaan verrattuna tuloksista voidaan päätellä RelBE toksiini-antitoksiinijärjestelmän vaikuttavat biofilmin muodostumiseen ja siten se voisi olla lupaava lääkekehityskohde. (30)

Samankaltaisia tuloksia on saatu muissakin tutkimuksissa, joten voidaan ajatella kyseisen tutkimuksen löydösten olevan edes suuntaa antavasti paikkansa pitäviä (33,34). Aiheesta tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta ennen lopullisia johtopäätöksiä RelBE:n soveltuvuudesta lääkekehityskohteeksi (30). RelBE toksiini-antitoksiinijärjestelmän mahdollinen vaikutusmekanismi lääkekehityskohteena on erilainen verrattuna muihin tässä työssä esiteltyihin toksiini-antitoksiinijärjestelmiin. Tämä on hyvä esimerkki siitä, että lääkevaikutus voidaan yrittää kohdentaa myös bakteerien eri ominaisuuksiin, eikä välttämättä suoraan itse bakteeriin. *P. aeruginosa* -bakteerin tapauksessa biofilmin muodostus edesauttaa sen patogeenisuutta ja lääkeresistenssin syntyä, joten lääkevaikutuksen kohdentaminen biofilmin muodostukseen voi parantaa sen lääkitsevyyttä (30).

3.6 MazEF toksiini-antitoksiinijärjestelmä

MazEF toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on löydetty muun muassa *Enterococcus faecalis* -, *Mycobacterium tuberculosis* -, *Klebsiella pneumoniae* -, *Escherichia coli* - ja *Staphylococcus aureus* -bakteereista, joista kaikista näistä tavataan antibiooteille resistenttejä kantoja. MazEF kuuluu tyyppin II toksiini-antitoksiinijärjestelmiin. MazF toksiini on endoribonukleaasi, joka katkaisee lähetti-RNA:ta bakteerilajista riippuen kolmen, viiden tai seitsemän emäksen pätkiin ja häiritsee siten bakteerien translaatiota. MazE-antitoksiini inhiboi MazF-toksiinin toiminnan. On havaittu, että MazEF osallistuu bakteereissa stressitilanteiden sietoon sekä biofilmin muodostukseen ja siten muun muassa edistää bakteerien antibioottiresistenttiyttä. (35–39)

Vaikka MazEF:n olemassaolo on tiedetty jo pitkään, ei siihen kohdistuvassa lääkekehityksessä ole päästy kovin pitkälle. Kuitenkin *E. coli* -bakteereissa on havaittu, että MazE-antitoksiinin estäminen PNA-oligomeereillä (engl. peptide nucleic acid) saa aikaan bakteerin kasvun estymisen. MazF-toksiinin indusoiminen on onnistuttu aikaansaamaan myös *thyA*-geenin estolla, joka johtaa tyymiinin vähäiseen määrään ja sitä kautta MazF-toksiinin aktivaatioon. Menetelmä on erilainen verrattuna tavallisesti käytettyyn suoraan toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen estoon (Kuva 3.). MazEF:n kiderakenne on onnistuttu selvittämään *Klebsiella pneumoniae* -bakteerista ja sen on todettu olevan heteroheksameerinen. (37,39)



Kuva 9. MazEF heteroheksameerin selvitetty kiderakenne *Klebsiella pneumoniae* -bakteerissa. Maz E:n ja MazF:n ketjut on nimetty kuvaan. Kuva lähteestä (39).

E. coli -bakteerista peräisin olevan MazF-toksiinin on havaittu pienentävän kasvaimia *in vivo*. Tutkimuksessa immuunipuutteisiin hiiriin inokuloitiin T-Rex 293- *mazF* -solulinjaa, joka on alkioautinen munuaissolulinja, johon on lisätty tetrasykliinillä indusoituva MazF-toksiini. Kaikkien hiirten kasvaimet pienenevät, kun MazF saatiin ilmentymään. Kyseinen tulos havainnollistaa, että toksiini-antitoksiinijärjestelmiä voidaan mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää myös muihin terapeuttisiin käyttötarkoituksiin bakteerisairauksien hoidon lisäksi. (40)

4 Johtopäätökset

Toksiini-antitoksiinijärjestelmiä on tutkittu jo pitkään ja niiden ominaisuuksista on saatu paljon tietoa. Monien järjestelmien rakenteista, toimintamekanismeista ja esiintymisestä eri bakteerilajeissa tiedetään jo paljon, mutta tähän mennessä löydetty tieto on kuitenkin murto-osa siitä, mitä toksiini-antitoksiinijärjestelmien syvälliseen tuntemukseen tarvitaan. Vaikka monia eri järjestelmiä on jo löydetty, on niitä ennustettu olevan moninkertainen määrä vielä löytämättä. Näiden järjestelmien merkityksestä bakteereille tiedetään jo jonkin verran, mutta niiden todellinen merkitys bakteerisolun toiminnalle on jäänyt vielä suurelta osin tuntemattomaksi.

Toksiini-antitoksiinijärjestelmiin kohdentuvaa lääkekehitystutkimusta on tehty muun tutkimuksen ohella jo pitkään. Mahdollisia lääkekehityskohteita on löydetty ja niihin on onnistuttu kehittämään jo peptidejä, jotka esimerkiksi estävät toksiini-antitoksiinikompleksin muodostumisen. Kuitenkin niin kuin tässäkin työssä esiteltujen toksiini-antitoksiinijärjestelmien kohdalla havaitaan, monen järjestelmän osalta lääkekehitys ei ole kovin pitkällä. Moniin järjestelmiin on onnistuttu kehittämään kompleksin hajottavia peptidejä, mutta tutkimus on jäänyt vaiheeseen, jossa seuraavana on löydettyjen peptidien ominaisuuksien optimointi. Toksiini-antitoksiinijärjestelmistä haastavan lääkekehityskohteen tekee se, että sen lisäksi että mahdollisen lääkeainemolekyylin pitää hajottaa toksiini-antitoksiinikompleksi, tulee sen päästä tehokkaasti bakteerisolun sisälle solukalvon läpi. Myös tiedon puute monelta näiden järjestelmien osa-alueelta hankaloittaa lääkemolekyylien ja lääkekehityskohteiden löytämistä. Monien haasteiden vuoksi yhtäkään julkaistua toksiini-antitoksiinijärjestelmiin kohdennettua lääkemolekyyliä ei ole kliinisen vaiheen tutkimuksissa, vaan kaikki tutkimukset tähän mennessä ovat prekliinisiä.

40 vuoden aikana tiedon määrä toksiini-antitoksiinijärjestelmien ensimmäisen havaitsemisen jälkeen on kasvanut kuitenkin valtavasti ja tietoa tulee kokoajan lisää. Antibioottiresistenttiysongelman kasvaessa paine löytää uusia lääkkeitä bakteerien aiheuttamien sairauksien hoitoon kasvaa. On siis oletettavissa, että toksiini-antitoksiinijärjestelmien osalta niihin kohdistuvan tutkimuksen määrä lisääntyy ja sitä kautta myös saadun tiedon määrä. Uusia toksiini-antitoksiinijärjestelmiä tullaan varmasti löytämään ja todennäköisesti myös mahdollisia lääkekehityskohteita. On odotettavissa, että tulevaisuudessa näihin järjestelmiin kohdistuvat tutkimukset pääsevät kliinisiin kokeisiin ja toivottavasti myös kliinisessä käytössä oleviksi lääkkeiksi. Voisi ajatella, että kun ensimmäinen potentiaalinen lääkeaineeksi soveltuva peptidi löydetään ja sen ominaisuudet saadaan optimoitua sopiviksi, niin se edesauttaisi muiden vastaavien peptidien kehittämistä. Vaikka bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät vaihtelevat eri lajien välillä, on niissä myös samankaltaisuutta, jolloin samoja hyväksi havaittuja ominaisuuksia voitaisiin hyödyntää myös muissa mahdollisissa lääkeainepeptideissä. Yhteenvetona: on oletettavissa, että toksiini-antitoksiinijärjestelmiin kohdistuva tutkimus lisääntyy ja tulevaisuudessa niihin kohdistuvia lääkkeitä pystytään kehittämään.

Lähteet

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance. 2023 [viitattu 24.5.2024] <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
2. THL. Antibioottiresistenssi . 2023 [viitattu 24.5.2024] <https://thl.fi/aiheet/infektioaudit-ja-rokotukset/audit-ja-torjunta/antibioottiresistenssi>
3. Jurénas D, Fraikin N, Goormaghtigh F, Van Melderen L. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature reviews Microbiology*, 20(6), 335–350 . 2022;
4. Hall AM, Gollan B, Helaine S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. *Curr Opin Microbiol*. 2017;36:102–10.
5. Leroux M, Laub MT. Toxin-Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annual review of microbiology*, 76, 21–43 . 2022;
6. Qiu J, Zhai Y, Wei M, Zheng C, Jiao X. Toxin-antitoxin systems: Classification, biological roles, and applications. *Microbiological research*, 264, 127159 . 2022 Nov 1;
7. Kang SM, Jin C, Kim DH, Park SJ, Han SW, Lee BJ. Structure-based design of peptides that trigger *Streptococcus pneumoniae* cell death. *FEBS J*. 2021 Mar 1;288(5):1546–64.
8. Freire DM, Gutierrez C, Garza-Garcia A, Grabowska AD, Sala AJ, Ariyachaokun K, et al. An NAD⁺ Phosphorylase Toxin Triggers *Mycobacterium tuberculosis* Cell Death. *Mol Cell*. 2019 Mar 21;73(6):1282-1291.e8.
9. Kang SM, Jin C, Kim DH, Lee Y, Lee BJ. Structural and Functional Study of the *Klebsiella pneumoniae* VapBC Toxin-Antitoxin System, including the Development of an Inhibitor That Activates VapC. *J Med Chem*. 2020 Nov 25;63(22):13669–79.
10. Cataudella I, Trusina A, Sneppen K, Gerdes K, Mitarai N. Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic acids research*, 40(14), 6424–6434 .
11. Ariyachaokun K, Grabowska AD, Gutierrez C, Neyrolles O. Multi-Stress Induction of the *Mycobacterium tuberculosis* MbcTA Bactericidal Toxin-Antitoxin System. *Toxins (Basel)*. 2020 May 1;12(5).
12. Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Sloth Andersen E, Kjaergaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* 2017;037:854–79.
13. Haenni M, Lupo A, Madec JY. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. 2018; *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017.
14. World Health Organization. Pneumonia in Children. 2022. [viitattu 24.5.2024] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>
15. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(5):402–10.

16. Yang J, Zhou K, Liu P, Dong Y, Gao Z, Zhang J, et al. Structural insight into the E. coli HigBA complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 30;478(4):1521–7.
17. Schureck MA, Maehigashi T, Miles SJ, Marquez J, Cho SE, Erdman R, et al. Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)₂-HigB toxin-antitoxin complex. *J Biol Chem*. 2014 Jan 10;289(2):1060–70.
18. Hadži S, Garcia-Pino A, Haesaerts S, Jurenas D, Gerdes K, Lah J, et al. Ribosome-dependent *Vibrio cholerae* mRNAse HigB2 is regulated by a β -strand sliding mechanism. *Nucleic Acids Res*. 2017 May 5;45(8):4972–83.
19. Sung-Min Kang. Focused Overview of Mycobacterium tuberculosis VapBC Toxin–Antitoxin Systems Regarding Their Structural and Functional Aspects: Including Insights on Biomimetic Peptides. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 8(5), 412.
20. Kang SM, Kim DH, Lee KY, Park SJ, Yoon HJ, Lee SJ, et al. Functional details of the Mycobacterium tuberculosis VapBC26 toxin-antitoxin system based on a structural study: insights into unique binding and antibiotic peptides. *Nucleic Acids Res* 2017;45(14):8564–80.
21. Lee IG, Lee SJ, Chae S, Lee KY, Kim JH, Lee BJ. Structural and functional studies of the Mycobacterium tuberculosis VapBC30 toxin-antitoxin system: implications for the design of novel antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jun 24;43(15):7624–37.
22. Chauhan U, Barth VC, Woychik NA. tRNA^{fMet} Inactivating Mycobacterium tuberculosis VapBC Toxin-Antitoxin Systems as Therapeutic Targets. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 May 1;66(5).
23. Sun H, Coussens NP, Danchik C, Wachsmuth LM, Henderson MJ, Patnaik S, et al. Discovery of VapC1 small molecule nuclease inhibitors by virtual screening and scaffold hopping from an atomic structure revealing protein-protein interactions with native VapB1 inhibitor *Journal of chemical information and modeling*, 62(5), 1249–1258.
24. Kang SM, Jin C, Kim DH, Lee Y, Lee BJ. Structural and Functional Study of the *Klebsiella pneumoniae* VapBC Toxin–Antitoxin System, Including the Development of an Inhibitor That Activates VapC. *Journal of medicinal chemistry*, 63(22), 13669–13679.
25. Li M, Gong L, Cheng F, Yu H, Zhao D, Wang R, et al. Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems. *Science (1979)*. 2021 Apr 30;372(6541).
26. Wang R, Shu X, Zhao H, Xue Q, Liu C, Wu A, et al. Associate toxin-antitoxin with CRISPR-Cas to kill multidrug-resistant pathogens. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).
27. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, Mcclean S. Molecular Sciences *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. 2021 *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128.

28. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019 Jan 1;37(1):177–92.
29. Fernandes M, Vira D, Medikonda R, Kumar N. Extensively and pan-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: clinical features, risk factors, and outcome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016 Feb 1;254(2):315–22.
30. Mahoudi M, Sadeghifard N, Maleki A, Yeo CC, Ghafourian S. relBE toxin- antitoxin system as a reliable anti- biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa*. 2022 *Journal of applied microbiology*, 133(2), 683–695.
31. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw.* 2017;71(0):78–91.
32. Bøggild A, Sofos N, Andersen KR, Feddersen A, Easter AD, Passmore LA, et al. The Crystal Structure of the Intact *E. coli* RelBE Toxin-Antitoxin Complex Provides the Structural Basis for Conditional Cooperativity. 2012 *Structure (London, England : 1993)*, 20(10), 1641–1648.
33. Van Acker H, Sass A, Dhondt I, Nelis HJ, Coenye T. Involvement of toxin-antitoxin modules in *Burkholderia cenocepacia* biofilm persistence. *Pathog Dis.* 2014;71(3):326–35.
34. Kim Y, Wang X, Ma Q, Zhang XS, Wood TK. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol.* 2009 Feb;191(4):1258–67.
35. Sadeghifard, N., Soheili, S., Sekawi, Z., & Ghafourian, S. (2014). Is the mazEF toxin-antitoxin system responsible for vancomycin resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*?. *GMS hygiene and infection control*, 9(1), Doc05
36. Tiwari P, Arora G, Singh M, Kidwai S, Prakash Narayan O, Singh R. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs. 2015; *Nature communications*, 6, 6059.
37. Kirienko N V, Kolodkin-Gal I, Chieng Yeo C, Trylska J, nko PT, Równicki M, et al. Artificial Activation of *Escherichia coli* mazEF and hipBA Toxin-Antitoxin Systems by Antisense Peptide Nucleic Acids as an Antibacterial Strategy. 2018; *Frontiers in microbiology*, 9, 2870.
38. Sierra R, Prados J, Panasenko OO, Andrey DO, Fleuchot B, Redder P, et al. Insights into the global effect on *Staphylococcus aureus* growth arrest by induction of the endoribonuclease MazF toxin. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(15):8545–61.
39. Jin C, Kang SM, Kim DH, Lee BJ. Structural and functional analysis of the *Klebsiella pneumoniae* MazEF toxin-antitoxin system. *IUCrJ*, 8(Pt 3), 362–371.

40. Shimazu T, Mirochnitchenko O, Phadtare S, Inouye M. E-Mail Regression of Solid Tumors by Induction of MazF, a Bacterial mRNA Endoribonuclease. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2014;24:228–33.