

Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa* jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů

K. NOVÁKOVÁ, M. KOLÁŘ

Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc

SOUHRN

Nováková K., Kolář M.: Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa* jako terapeutický cíl u multirezistentních kmenů

Bakterie druhu *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) jsou známy svou schopností tvořit biofilm a další produkci faktorů virulence asociovaných s rezistentním fenotypem. Multirezistentní (MDR) PSAE jsou významným problémem ve zdravotnictví, na který se soustředí čím dál více studií zabývajících se terapií infekcí vyvolanými těmito kmeny. V řadě recentních studií se však pozornost zaměřuje spíše na přítomnost faktorů virulence než mechanismů rezistence k užívaným antibiotikům, neboť právě studium faktorů virulence umožňuje rozšířit možnosti efektivní a účelné terapie. V tomto přehledovém článku jsou popsány faktory virulence (FV), vyučované jedním z pěti používaných sekrečních systémů PSAE, u nichž byl pozorován potenciál stát se cílem tzv. antivirulentní terapie infekcí vyvolaných MDR PSAE. Jedná se zejména o alkalickou proteázu (AprA), elastázu B (LasB), exotoxiny A, S a Y (exo-A/S/Y) a pyocyanin. Recentní studie se také kromě konkrétních faktorů virulence zaměřují na složky sekrečních systémů PSAE, které transportují toxiny a lytické enzymy z bakteriální buňky. Inhibice specifických molekul pro sekreční systémy typu 2 a 3 (T2SS a T3SS) může dojít k zábraně sekrece FV do extracelulárního prostoru a hostitelských buněk, což by mělo významný dopad na snížení virulence PSAE.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, multirezistence, faktory virulence, antivirulentní terapie

SUMMARY

Nováková K., Kolář M.: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors as a therapeutic target in multidrug-resistant strains

Pseudomonas aeruginosa (PSAE) is known for its ability to form biofilm and produce other virulence factors associated with a resistant phenotype. Multidrug-resistant (MDR) PSAE strains represent a serious problem in healthcare and are the focus of an increasing number of studies dealing with the therapy of infections caused by these bacteria. Nowadays, a number of studies focus on the presence of virulence factors rather than on the mechanisms of resistance to the antibiotics used, as it is the study of virulence factors that makes it possible to expand the possibilities of effective and efficient therapy. This review describes the virulence factors produced by the one of the five PSAE secretion systems that have the potential to become targets for so-called antivirulence therapy, have been described. These are mainly alkaline protease, elastase B, exotoxins A, S and Y and pyocyanin. In addition to specific virulence factors, recent studies have focused on the components of the PSAE secretion systems that mediate the transport of toxins and lytic enzymes out of the bacterial cell. Inhibition of specific molecules for type 2 and 3 secretion systems may prevent secretion of virulence factors into the extracellular space and host cells, which would have a significant impact on reducing PSAE virulence.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance, virulence factors, antivirulence therapy

Klin mikrobiol inf lék 2023;29(1):11–19

Adresa: Mgr. Kristýna Nováková, Ph.D., Ústav mikrobiologie, LF UP Olomouc, FN Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc,
e-mail: Kristyna.Novakova@fnol.cz

Došlo do redakce: 15. 3. 2023

Schváleno k tisku: 20. 5. 2023

Úvod

Multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) byly v roce 2017 dle WHO zařazeny mezi bakterie s urgentní potřebou pro vývoj nových antibiotik [1]. Obecně se bakterie tohoto druhu vyznačují vysokou odolností vůči zevnímu prostředí, včetně dezinfekce, a bývají proto častým původcem nozokomiálních infekcí. Při léčbě nozokomiálních infekcí je proto potřeba terapie rezervními antibiotiky, což při-

spívá k nárůstu výskytu multirezistentních (MDR) bakterií. U gramnegativních nefermentujících bakterií druhu PSAE byla zaznamenána řada primárních i sekundárních mechanismů rezistence, představujících hrozbu pro současné terapeutické postupy. Rozšířené mechanismy rezistence u PSAE jsou dány vysokou variabilitou genomu. Právě plasticita genomu vede k rychlé evoluci pseudomonád, kvůli které je studium nových antimikrobiálních látek neustále ohroženo

dalšími indukovanými mechanismy rezistence [2]. Proto se v poslední době studie zaměřují také na možnosti tzv. antivirulentní terapie. Jedná se o strategii cílcí na konkrétní faktory virulence (FV) PSAE, jako jsou proteolytické enzymy nebo faktory asociované se schopností tvořit biofilm.

Sekreční systémy *Pseudomonas aeruginosa*

Export toxinů a lytických enzymů sloužících jako faktory virulence bakterií je zajišťován různými typy sekrečních systémů ("the type x secretory system" TxSS). U pseudomonád jsou ve vztahu k virulenci relevantní sekreční systémy typu I, II, III, V a VI [3]. Sekreční systém typu I (T1SS) představuje spolu se sekrečním systémem typu V (T5SS) nejjednodušší dráhu pro transport látek do extracelulárního prostoru, ačkoliv se liší jejich mechanismus transportu. Sekreční systém typu II (T2SS) patří mezi nejrozšířenější sekreční systémy u gramnegativních bakterií. Z hlediska terapeutického potenciálu je u PSAE nejdůležitějším sekrečním systémem spolu se sekrečním systémem typu III (T3SS). Jedná se totiž o systémy transportující řadu látek s cytotoxickým účinkem na hostitelskou buňku, jejichž přítomnost byla detekována u většiny pseudomonád způsobujících těžké infekce. Disfunkce nebo úplná absence T2SS a T3SS aparátu významně snižuje virulenci PSAE. Proto se kromě efektorových proteinů sekrečních systémů, představujících FV u PSAE, některé výzkumy zaměřují na možnosti inhibice samotného sekrečního systému prostřednictvím přímé interakce látek se složkami těchto sekrečních systémů nebo např. vývojem protilátek proti složkám T3SS [4–6].

Obecně se mohou sekreční systémy rozdělovat do dvou typů. Jednokrokové a dvoukrokové sekreční systémy. Jednokrokové sekreční systémy dopravují látky přímo z cytoplasmy na povrch bakteriálních buněk. Takový mechanismus využívá T1SS, který transportuje látky do vnějšího prostředí nebo T3SS a T6SS, které přímo vstříkují exolátky do hostitelských buněk [7,8]. Systémem T3SS jsou vstříkovány toxiny a bakteriální DNA do hostitelských buněk prostřednictvím útvaru připomínajícího jehlu, proto bývá tento aparát označován jako injektozem. Tento injektozem je sestaven ze strukturálních proteinů, bez kterých nelze translokovat toxiny přes cytoplasmatickou membránu (CM) do hostitelské buňky, proto by mohly představovat cíle pro antivirulentní terapii, např. protein PcrV [9]. Ve výše popsaném transmembránovém exportním komplexu je T3SS využíván jak pro stavbu samotné extracelulární jehly, tak pro přímý transport efektorových proteinů do hostitele [10]. Oproti tomu dvoukrokové sekreční mechanismy se vyznačují syntézou prekurzoru daného exoproteinu a jeho exportu prostřednictvím obecné sekretorické dráhy Sec přes CM do periplazmy, kde už se protein nachází ve svém zralém stavu. Proteiny transportované Sec dráhou se vyskytují v nesbaleném stavu a mají N-terminální signální sekvence, které jsou při translokaci přes CM odštěpeny. Kromě Sec dráhy může být prekurzor translokován přes CM do periplazmy také dráhou Tat ("twin-arginine translocase"), která je využívána pro export již sbalených proteinů za účasti kofaktorů [8,11]. Odtud je poté zralý protein přenesen příslušným typem sekrečního systému T2SS nebo T5SS. Lze rozlišit čtyři komplexy T2SS, z nichž proteiny hlavního komplexu T2SS vykazují sekven-

ční homologii s podjednotkami tvořícími bakteriální pilus typu IV, proto bývají označovány jako pseudopilus [12]. Pseudopilus zde hraje roli pístu, poháněným GspE ATPázou, kterým jsou exoproteiny vytačovány ven z buňky přes sekreční kanály [8]. U T5SS jsou transportovány velké proteiny asociované se schopností adheze PSAE [13]. Nejprve je protein přenesen přes CM Sec dráhou, a poté je transportován přes poriny vnější membrány, na kterých budou setrvá, nebo je proteolyticky štěpen a uvolněn do extracelulárního prostoru. U gramnegativních bakterií existují dva podtypy T5SS, a to autotransportéry (T5aSS a T5cSS) a tzv. TPS sekrece ("two-partner secretion") nebo-li T5bSS, která je obecně u gram-negativních bakterií přímo určena pro sekreci dlouhých proteinů [8]. Sekreční systémy PSAE jsou znázorněny na obrázku 1.

Efektorové proteiny sekrečního systému typu I

Alkalická proteáza

T1SS pseudomonády využívají pro transport alkalické proteázy (AprA). AprA se účastní degradace dvou základních komponent endotelu a bazální laminy, fibronektinu a laminu [15]. Zároveň byla u této proteázy dokumentována schopnost rozkládat a štěpit proteiny komplementu, jako je C1q, C2, C3 nebo C5a a cytokinů IFN- γ , TNF- α umožňující PSAE fagocytární únik [16–18]. Kromě degradace cytokinů a složek komplementu byla u AprA proteázy pozorována schopnost štěpit bakteriální flagelin, a tudíž potlačit aktivaci toll-like receptorů (TLR-5), které rozpoznávají bičíkaté bakterie, a umožňují tak účinnou likvidaci širokého spektra mikroorganismů [17]. V nedávné studii byla popsána schopnost této proteázy přímo degradovat neutrofilní extracelulární pasti ("neutrophile extracellular traps", NETy), jejichž tvorbu sami podnácejí [19]. NETy jsou 3D síť tvořené zejména z dekondenzované DNA neutrofilů a z granulárních a cytoplasmatických proteinů procesem zvaným netóza. Jedná se o specifický způsob buněčné smrti neutrofilů, během nějž dochází k uvolnění 3D síti pro polapení bakterií a mikroskopických hub jako reakce na probíhající zánět v makroorganismu [20,21]. Rozrušení NETů prostřednictvím AprA hraje klíčovou roli u pseudomonádových plicních infekcí [19]. Kromě samotné schopnosti způsobit patologický stav u hostitele prostřednictvím zmíněných mechanismů účinku je AprA vhodným adeptem pro antivirulentní terapii i díky své detekované přítomnosti u PSAE s rezistencí ke karbapenemům [22], a dokonce nejčastější prevalenci ze všech testovaných faktorů virulence u MDR kmenů PSAE (67,2 %) [23].

Jedním z přístupů zabývajících se vývojem terapeutických látek proti PSAE je navržení molekul odvozených od přirozeného inhibitoru této proteázy (AprI) kódovaného samotnou PSAE [17]. V současné době však není žádná zpráva o pokroku vývoje léku na základě strukturní homologie s AprI. Bohužel ani další publikace od stejněho autora nezasvědčují posunu v této problematice. Recentní studie Hirakawa a kol., zabývající se komplexnějším úhlem pohledu, nabízejí alternativní možnost léčby MDR PSAE prostřednictvím vývoje léku na základě použití makroporézního uhlíkatého materiálu na bázi oxidu hořečnatého (MgO).

Tento materiál, MgOC₁₅₀, adsorbuje extracelulární protein, jako je pyocyanin. Tato schopnost významně přispívá k atenuaci toxicity PSAE v lidských epitelálních buňkách [24]. Makroporézní materiál na bázi MgO kromě FV PSAE adsorbuje také Shiga toxin a efektorové proteiny sekrečního systému T3SS u enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* [25]. Přes potvrzenou schopnost MgOC₁₅₀ suprimovat faktory virulence bakterií *in vitro* a *in vivo* je stále otázkou, v jaké podobě, a zda-li jej vůbec bude možné aplikovat v klinické praxi.

Ačkoli je T1SS dobře prostudován, dosud nejsou známy sloučeniny, které by jej blokovaly. Vzhledem k většímu významu ostatních sekrečních systémů PSAE, které tato bakterie používá pro transport toxinů a lytických enzymů, současné studie vyvíjejí antivirulentní látky proti PSAE zřejmě neuvažují o T1SS jako o vhodném terapeutickém cíli.

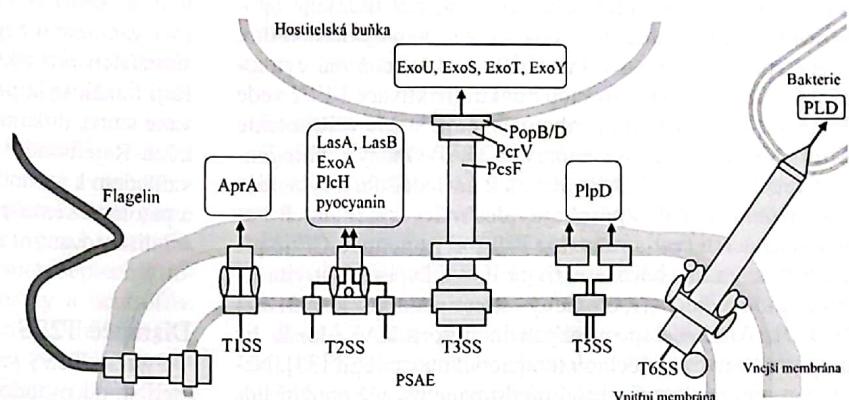
Efektorové proteiny sekrečního systému typu II

Systémem T2SS jsou z bakteriální buňky uvolňovány FV, které se uplatňují při akutních pseudomonádových infekcích [3]. Jedná se o toxiny, jako je stafylolytická proteáza (lasA) a elastáza B, nebo-li tzv. pseudolysin (lasB), fosfolipáza C (PlcH), pyocyanin nebo exotoxin A (exoA). Zinkové metaloproteázy, zejména lasA a lasB, mají z hlediska cílů pro antivirulentní terapii nejpodstatnější význam. V recentní studii Vermilyea a kol. byla prokázána inhibice aktivity těchto proteáz ve sputu získaných od pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) prostřednictvím zinkové chelatace zprostředkované rekombinantním lidským kalprotektinem [26]. Chelatací bylo dosaženo post-translační inhibice proteolytických aktivit lasA i lasB, což by mělo mít za následek snížení virulence PSAE kolonizující dýchací cesty pacientů s CF.

Elastáza B

Elastáza, konkrétně lasB, je velice diskutovaným efektorovým proteinem vzhledem k jeho abundantnímu výskytu u MDR pseudomonád a jeho proteolytické činnosti působící na elastin, fibronectin, kolagen a další komponenty extracelulárního matrix [23,27–29]. U této elastázy byla zároveň pozorována schopnost podkopávat aktivitu alveolárních makrofágů (AM) prostřednictvím inhibice aktivity komplementu, omezení tvorby reaktivních forem kyslíku generovaných AM a snížená aktivita činnosti nespecifických imunitních reakcí makroorganismu [30]. Kromě její participace v mnoha pochodech inhibujících imunitní systém (IS) hostitele byla u lasB pozorována naopak přímá podpora aktivačí časně prozánětlivé signální molekuly IL-1β a indukce neutrofilního zánětu, vedoucího k destrukci plicní tkáně charakteristické pro těžké pseudomonádové plicní infekce [31], což samo o sobě napovídá o zapojení lasB do etiopatogeneze respiračních onemocnění. V neposlední řadě je lasB

Obrázek 1
Sekreční systémy PSAE (převzato ze studie Liao a kol. 2022) [14]. Vyučované FV příslušným sekrečním systémem jsou uvedeny v obrazci nad každým typem sekrečního systému. Popis těchto FV se věnují následující kapitole.



asociována také se schopností zamezit proteázově-dependenčním imunomodulačním pochodům hostitele prostřednictvím degradace bakteriálního flagelinu spolu s AprA za nedostatku vápníku a s tvorbou biofilmu [32,33]. Právě kvůli širokému spektru účinku lasB v hostitelských buňkách představuje zajímavý terapeutický cíl.

Pro účely antivirulentní terapie byly prozkoumány možnosti přirozených i syntetických inhibitorů lasB [34]. Ve studii Galdino a kol. byly studovány účinky odvozených sloučenin od 1,10-fenantrolin-5,6-dionu (fendionu). Zejména s navázánou měďí zmírnil tento ligand toxicitní účinek jak purifikovaných molekul lasB, tak bakteriálních sekretů obsahujících lasB v modelu *in vivo*, čímž prodloužil dobu přežití exponovaných larev zavíječe voskového [28]. Molekulární dokovací studie podpořily vazbu tohoto zkoumaného komplexu na lasB, ale k úplnému pochopení mechanismu inhibice je nutná rentgenová krystalografie spolu s dalšími studiemi zabývajícími se interakcí lasB inhibitorů se systémem modelových organismů [34]. Dalším nadějným inhibitem je derivát N-aryl merkaptoacetamidu. Kaya a kol. zdokumentovali pozitivní účinek tohoto derivátu na lidské plicní a kožní buňky, které byly ošetřeny supernatantem obsahujícím lasB. Bylo prokázáno udržení integrity exponovaných plených a kožních buněk a snížení virulence bakterií. Zároveň byla pozorována zvýšená míra přežití larev zavíječe voskového ošetřených supernatantem kultury PSAE produkujících lasB [35]. Ve studii Yahiaoui a kol. byla spolu s inhibičním efektem derivátu N-aryl merkaptoacetamidu na lasB prokázána také schopnost potlačovat produkcii metalo-β-laktamázu u bakterie *Klebsiella pneumoniae*, [36], což nabývá na významu této sloučeniny.

Studie, které projevují snahu o zavedení aplikace výše zmíněných dvou sloučenin (fendionu a derivátu N-aryl merkaptoacetamidu) do klinické praxe, se v současné době nachází v preklinické fázi. Vzhledem k dosavadním datům dokládajícím jejich netoxické působení na lidské buněčné linie by se mohlo jednat o sloučeniny s obrovským potenciálem.

Exotoxin A

ExoA je ribotoxin vyplavovaný pomocí T2SS během chronických pseudomonádových infekcí. ExoA indukuje ADP-ribosylaci, a tedy inaktivaci eukaryotického elongačního faktoru 2 (EEF2). V důsledku inaktivace EEF2 se zastaví biosyntéza hostitelského proteinu, což indukuje apoptózu buňky [37]. Jedná se tedy v podstatě o cyklomodulin, který způsobuje zástavu buněčného cyklu, což má cytotoxicický účinek na exponovanou buňku. Inaktivace EEF2 vede k ZAK α -dependentnímu ribotoxickému stresu ("Ribotoxic Stress Response", RSR), k aktivaci MAP-kinázy ("Mitogen-Activated Protein", MAP), P38, a k následné fosforylací inflamazómu NLRP1 způsobující destrukci epiteliálních buněk dýchacích cest a rohovky. Právě u pacientů s CF je při exacerbacích detekována aktivita P38 a hypersenzitivita na exoA-indukovaný ribotoxický stres vedoucí k aktivaci NLRP1. Aplikace specifických inhibitorů ZAK kináz by tedy představovala účelnou terapeutickou strategii [38]. Nadějnou antivirulentní terapii představuje rovněž použití lidských jedno-řetězcových protilátek ("human single-chain antibodies", HscFvs) s vysokou afinitou k exoA. Počítacová simulace prokázala, že tyto vytvořené HscFv využívají několik zbytků ve svých oblastech určujících komplementaritu (CDR) k vytvoření interakce s katalyticky aktivním místem exoA, který je nezbytný pro ADP-ribosylaci EEF2. Po expozici buněk exoA ošetřených HscFvs protilátkami byla pozorována inhibice apoptózy buněk, dokonce byla snížena exprese genů asociovaných s apoptózou, cas3 a p53. Účinnost těchto protilátek by měla být otestována na zvířecích modelech s návazností na klinické studie. Z prozatímních dat však vyplývá, že by se mohlo jednat o bezpečnou, účelnou a vysoce efektivní látku zmírnějící patologický efekt PSAE u obtížně léčitelných infekcí [39].

Fosfolipáza C

Kromě inhibitorů proteáz je v řešení také možnost zacílit a potlačit aktivitu dalšího faktoru virulence, a to fosfolipázy C (PlcH). Jedná se o klíčový modulátor exprese prozánětlivého interleukinu IL-8 v epiteliálních buňkách bronchiolů pacientů s CF [40], přímo asociovaného s dysfunkcí plicního surfaktantu [41]. Ve studii Wolfmeier a kol. byl úspěšně aplikován lipozom obsahující sfingomyelin (Sm) na vysoce virulentní kmen PSAE získaný od pacienta s CF. Po expozici byla u tohoto kmene prokázána neutralizace cytolytické aktivity PlcH, což otevírá nové možnosti terapie infekcí způsobených i ostatními gramnegativními bakteriemi produkujícími PlcH [42].

Pyocyanin

Pyocyanin je metabolitem systému quorum sensing (QS), který je sekretován přes CM pomocí T2SS. Obecně je tento fenazin znám pro svou schopnost propůjčit pseudomonádám zeleno-modré zbarvení. Nejdále se pouze o neškodný pigment, vyznačuje se také schopností indukovat oxidativní stres v hostitelských buňkách, inhibicí aktivity B a T lymfocytů, makrofágů a indukcí apoptózy neutrofilů [3]. Působením pyocyaninu v makroorganismu dochází k supresi přirozené i získané imunity [43]. Zejména u pacientů s CF představuje pyocyanin hrozbu, vzhledem k jeho schopnosti indukovat nekontrolovatelné vyplavení NET sítí vedoucí k exa-

cerbaci a poškození plicní tkáně [44]. Toxicita tohoto pigmentu významně ovlivňuje průběh respiračních infekcí, a proto se v současné době různé studie zaměřují na jeho neutralizaci prostřednictvím působení specifických protilátek. Např. studie Susilowati a kol. demonstrovala protektivní účinek Anti-PCN IgY protilátek získaných imunizací kuřat pyocyaninem u exponovaných buněčných linií B lymfocytů sloužících pro výzkumné účely, tzv. Raji buněk. U těchto Raji buněk byla pozorována inhibice pyocyaninem-indukované smrti, dokonce byla popsána zvýšená vitalita zkoumaných Raji buněk [43]. Vývoj terapeutických protilátek je vzhledem k jednoduché dostupnosti, ubikvitárnímu výskytu a patologickému efektu pyocyaninu v makroorganismu velmi diskutovaným tématem [3].

Disrupce T2SS

Systém T2SS se skládá z pěti pseudopilinů, kompletujících se do pseudopilu, který funguje jako písť k vytlačení exoproteinů z buněk. Stanovením struktury pseudopilinových komplexů XcpVWX a XcpVW a funkční analýzou bylo ve studii Zhang a kol. potvrzeno, že dva pseudopiliny, XcpV a XcpW, tvoří jádrový komplex nepostradatelný pro hrot pseudopilu. Absence buď XcpV, nebo XcpW vede k nefunkčnosti T2SS. V této studii byly na základě informací o architektuře pseudopilu z měření maloúhlového rentgenového záření („Small Angle X-ray Scattering“, SAXS) a následném interakčním rozhraní komplexů vyvinuty inhibiční peptidy narušující komplex XcpVW a tedy celý hrot pseudopilu *in vitro* a *in vivo*. Účinnost těchto peptidů byla zkoumána v modelovém organismu, hádátku obecném. Při expozici těchto červů byla pozorována snížená virulence PSAE dokazující inhibiční účinek aplikovaných peptidů [45]. Kromě samotné struktury pseudopilu se řada studií zaměřuje na vývoj látek blokujících Tat dráhu, která je uplatňována před samotnou sekrecí proteinu z periplazmy do extracelulárního prostoru pomocí T2SS.

Pro tyto účely je používána metoda využívající vysoce výkonné screening ("high-throughput screening" HTS). Za použití HTS bylo ve studii Massai a kol. vyhodnoceno cca 40 000 molekul a identifikováno 59 počátečních hitů jako možné inhibitory Tat. V této studii byla použita PlcH jako chromogenní substrát pro testování inhibičního účinku látek, která je exportována do periplazmy pomocí Tat a následně translokována přes vnější membránu T2SS. Snaží se Massai a kol. vedle k identifikaci tří Tat inhibitorů a jednoho inhibitoru T2SS. Ačkoli žádný z identifikovaných inhibitorů nebyl vhodný jako hlavní sloučenina pro vývoj léčiv, tato studie potvrzuje potenciál využití HTS jako efektivního způsobu pro identifikaci inhibitorů Tat a T2SS [5]. V další recentní studii byla pomocí *in silico* analýzy identifikována sloučenina s inhibičním účinkem za použití proteinu ExoA jako sekretovaného markeru u PSAE. Tato identifikovaná sloučenina, která je příbuzná nedávno popsané látce s antimikrobiálním účinkem vůči *Proteus mirabilis* [46], velmi účinně inhibovala sekreci ExoA, nicméně v dalším testování vykazovala problémy se solubilitou v kultivačním médiu při koncentraci vyšší než 250 μ M. Pod touto hranicí koncentrace u ní nebyla prokázána schopnost inhibovat samotný růst PSAE. Vzhledem k prokázané netoxicitě

pro lidskou buněčnou linii A549 však tento inhibitor splňuje požadavky na blokátory virulence bakteriálních systémů [6].

Efektorové proteiny sekrečního systému typu III

Pomocí T3SS pseudomonády injektují toxiny, jako jsou exotoxiny S, T, U a Y (exo-S,T,U,Y) do hostitelských buněk makroorganismu. Tyto toxiny se uplatňují zejména u lokalizovaných infekcí, jako jsou oční infekce nebo pneumonie [3]. U exoY byla prokázána schopnost hromadit cyklické nukleotidy v hostitelské buňce prostřednictvím své nukleotid-cyklázové aktivity. Po infekci myší plicní tkáně pseudomonádou produkující exoY byla pozorována hemoragie, tvorba intersticiálního edému v alveolárních septech a infiltrace perivaskulárního prostoru erytrocyty a neutrofily. Analýza patogeneze na molekulární úrovni potvrdila zvýšenou sekreci cytokinů a prevalenci apoptózy postižených buněk zároveň s celkovým narušením integrity plicní tkáně [47].

Exotoxin S

Exotoxiny exoS a exoT vykazují 76% sekvenční homologii. V obou případech se jedná o bifunkční cytotoxiny s GTPázovou a ADP-ribosyltransferázovou (ADPr) aktivitou. Oba uvedené cytotoxiny způsobují narušení aktinového cytoskeletu hostitelské buňky pro účely adheze PSAE. Zároveň u nich byla pozorována schopnost indukovat apoptózu hostitelské buňky [14]. Konkrétně exoS je spojován s irreverzibilní destrukcí pulmonárně-vaskulární bariéry vedoucí k diseminaci PSAE, a tedy zhoršení prognózy pacientů s pneumonií [48]. Tento exoprotein vykazuje antifagocytární a cytotoxickou aktivitu. Jeho roli se z hlediska intracelulární perzistence PSAE snažila objasnit nedávná studie Kroken a kol. Výsledky této studie dokazují dvě další role ExoS prostřednictvím své ADPr aktivity při sledování intracelulárního životního cyklu PSAE; potlačení smrti hostitelské buňky pro zachování replikačního cyklu PSAE a inhibice antifagocytárních aktivit ostatních efektorových molekul T3SS pro umožnění bakteriální invaze. Tato zjištění přispívají k rostoucímu množství důkazů, že exoS-kódující (inaktivní) kmeny PSAE mohou být fakultativními intracelulárními patogeny [49]. Kromě role exoS při patogenezi různého spektra onemocnění byl ve vysoké míře exoS spolu s exotoxinem U (exoU) detekován u MDR klinických izolátů PSAE, proto jsou tyto toxiny považovány za vhodné terapeutické cíle [50].

Vysoko výkonný screening za použití optimalizované fluorescenční eseje s detekcí real-time identifikoval sloučeninu STO1101 inhibující toxicitou aktivitu exoS *in vitro*. Tato studie navrhuje design inhibitoru exoS na základě chemické struktury STO1101,

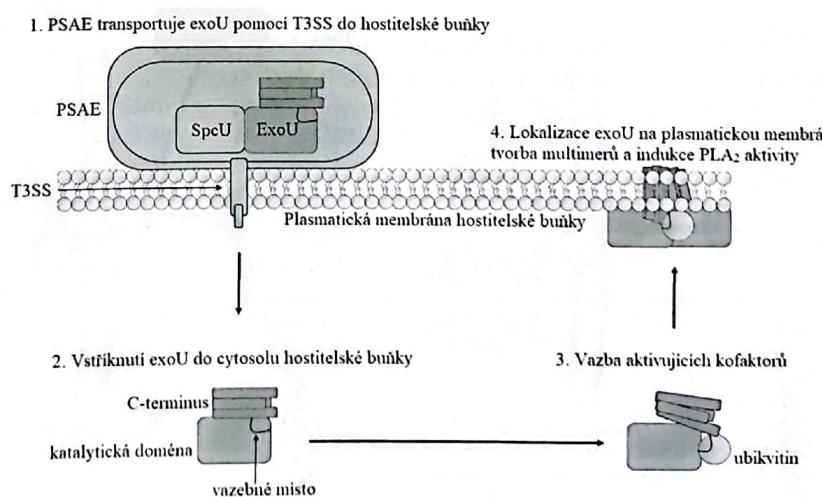
který by vykazoval účinnost také *in vivo* [51]. Kromě objevu nových inhibičních sloučenin se výzkumy zabývají také potenciálem již popsaných, v praxi aplikovaných látek. Za předpokladu, že by ibuprofen mohl zmírnit virulenci PSAE prostřednictvím inhibice T3SS bylo v nedávné studii Cao a kol. zjištěno, že ibuprofen nejen, že působí bakteriostaticky na PSAE samotnou, ale potlačuje expresi exoS snížením exprese regulačního genu T3SS, ExsA [52].

Exotoxin U

Zatímco aktivita ExoS je spojena s průnikem PSAE za vzniku membránových vezikulů umožňujících intracelulární přežití, exprese ExoU způsobuje rychlou destrukci plazmatické membrány hostitelské buňky. ExoU je považován za nejtoxičtější efektorový protein T3SS, který disponuje fosfolipázovou aktivitou A₂ (PLA₂) způsobující irreverzibilní destrukci buněčných membrán s následnou nekrózou [53]. U PSAE produkovajících exoU byla na myších popsaná jeho spojitost s rozvinutím septického šoku v návaznosti na pneumonii [54]. Infekce plicních mikrovaskulárních endotelialních buněk ("pulmonary microvascular endothelial cell" PMVEC) kmeny PSAE produkovajícími exoU spustila robustní generaci ROS oproti PMVEC vystaveným PSAE bez exprese ExoU. Fosfolipázová aktivita exoU byla pozorována také u mitochondrií vystavených buněk PMVEC [55].

Přestože mechanismus regulace exprese exoU zatím nebyl zcela objasněn, bylo prokázáno, že pro úspěšnou sekreci exoU je vyžadován chaperon SpcU, který umožňuje rozbalení molekuly exoU a její transport pomocí injektozomu do cytosolu hostitelské buňky. Tento chaperon však nepokračuje spolu s exoU na plazmatickou membránu exponované buňky, pouze exoU doprovází ven z bakteriální buňky [56]. Zároveň bylo dokumentováno, že fosfolipázová aktivita ExoU je pozorovatelná pouze za přítomnosti lyzátu savčích buněk CHO ("Chinese Hamster Ovary"). Určité eukaryotické hos-

Obrázek 2
Mechanismus toxicity exoU (převzato z Foulkes a kol., 2019) [60]



titelské kofaktory tedy přímo interagují s ExoU a jsou nutné pro indukci jeho cytotoxické a lytické fosfolipázové aktivity [57]. Následně bylo demonstrováno, že ExoU je aktivován enzymem superoxid dismutázou 1 (SOD1) [58]. Kromě působení SOD1 je pro efektivní utilizaci fosfolipidů vyžadována také lokalizace exoU na plazmatické membráně hostitelské buňky zároveň s jeho ubikvitinací, což koreluje s tvrzením, že pro aktivaci exoU jsou nutné eukaryotické kofaktory, v tomto případě ubikvitin [59]. Dokud je exoU vázán na SpcU, jedná se o neaktivní protein, avšak po jeho ubikvitinaci, následné lokalizaci na plazmatickou membránu a oligomerizaci se začne projevovat PLA2 aktivita (obrázek 2) [60].

ExoU by mohl být jako farmakologický cíl kompatibilní s používanými antibiotiky, přičemž inhibitory ExoU by sloužily jako adjuvantní terapie. Tímto způsobem by inhibitory exoU mohly zmírnit drastické cytotoxické účinky, zatímco konvenční antibiotika by eliminovala PSAE. Kromě strategií pro objevování nových antivirulentních sloučenin jsou zapotřebí další strukturální analýzy, na základě kterých by mohly být prováděny molekulárně řízené designy již objevených inhibitorů ExoU pro jejich bezpečné použití *in vivo* [60]. Ve studii Foulkes a kol. se podařilo pomocí buněčných esejí, fluorescenční mikroskopie a molekulárního dokování vyhodnotit efektivní nízkomolekulární inhibitory exoU; pseudolipasin A (PSA), sloučenina A a sloučenina B. Pomocí simulací molekulárního dokování bylo potvrzeno, že PSA, sloučenina A a sloučenina B jsou schopny kompetitivní inhibice fosfolipázové aktivity exoU *in vitro*. Zároveň byla v této studii prokázána schopnost těchto tří látek zmírnit ExoU-dependentní cytotoxicitu po infekci HCE-T ("Human corneal epithelial cell-transformed") buněčné linie v koncentracích pod 0,5 mM. Po přidání antimikrobiální látky, konkrétně moxifloxacinu, bylo docíleno jak inhibice cytotoxického působení exoU, tak inhibice růstu PSAE. Tento experiment tedy dokazuje synergické působení anti-

virulentní látky s antibiotikem. Zároveň studie dokazuje efektivní použití jejich testovacího modelu pro identifikaci účinných inhibitorů ExoU [61].

Disrupce T3SS

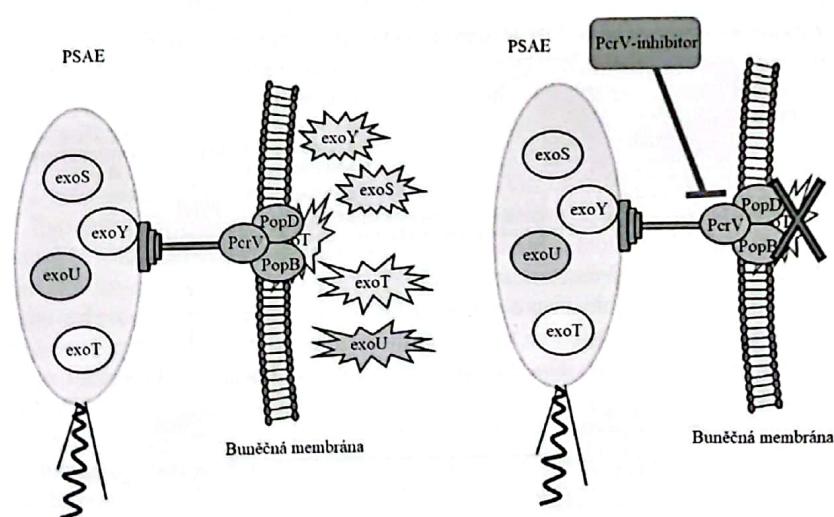
Součástí molekulárního komplexu T3SS jsou proteiny PopD, PopB a PcrV spolu s PcrG. Jedná se o proteiny na samotné špičce injektozomu. Své místo zde má také zatím nezmoc detailně charakterizovaná molekula PscF, která prezentuje středovou část jehly (viz obrázek 1). Nicméně vzhledem k této vysoce konzervované části T3SS vyskytující se u všech pseudomonád a yersinií by PscF molekula mohla představovat zajímavý terapeutický cíl. PopD a PopB tvoří heterodimer, který umožňuje sestavení funkčních translokonů s jejich následnou penetrací do cílové buněčné struktury. PcrV a PcrG jsou heterodimery tvořící integrální část hrotu injektozomu. PcrV, nebo-li V antigen PSAE, je asociován se zhoršenou prognózou pacientů a s antibiotickou rezistencí PSAE. Pro svou imunogenitu je molekula PcrV používána pro vývoj vakcíny proti pseudomonádovým infekcím [3,62].

O PcrV proteinu je však uvažováno také z hlediska antivirulentní terapie. V recentní studii bylo zanalyzováno 7 600 malých molekul, které by mohly vykazovat vysokou afinitu k PcrV. Z tohoto souboru molekul byly vybrány netoxické blokátory PcrV, díky kterým bylo dosaženo snížení virulence PSAE prostřednictvím blokace T3SS (obrázek 3). Tyto sloučeniny s inhibiční aktivitou jsou malé velikosti, vykazují dobrou rozpustnost ve vodě a teoreticky je lze upravit pro lékařskou medikaci. Na základě výše uvedených vlastností by se mohly využít jako odrazový můstek pro další vývoj [9].

Na PcrV se soustředují také studie zabývající se vývojem aplikovatelných protilátek. KB001-A je pegylovaný fragment monoklonální protilátky proti T3SS s anti-PcrV aktivitou. Na souboru CF pacientů byla provedena dvojitě zaslepená srovnávací studie, ve které byla prokázána bezpečnost a dobrá snášenlivost sloučeniny KB001-A u testovaných subjektů.

Nicméně zde byla dokumentována nedostatečná účinnost KB001-A [63]. Naopak k pozitivním závěrům dospěla studie Ali a kol., ve které byl pozorován účinek látky MEDI13902. Jedná se o bivalentní, bispecifickou monoklonální protilátku třídy imunoglobulinu G1k, která se váže jak na protein PcrV, tak na exopolysacharid Psl umožňující kolonizaci a adherenci PSAE k buňkám makroorganismu. V klinické studii fáze 1 byla prokázána bezpečnost a efektivita látky MEDI13902 u zdravých subjektů. Vzhledem ke skutečnosti, že MEDI13902 je vyvíjena pro prevenci nozokomiálních infekcí způsobených PSAE, potvrdila tato studie potenciál její aplikace na rizikové pacienty [64]. Po vyhodnocení klinické fáze 2 pro MEDI13902 u pacientů s pseudomonádovou pneumonií nebyla prokázána

Obrázek 3
Inhibice PcrV a zábrana translokace toxinů do hostitelské buňky prostřednictvím T3SS (převzato ze studie Sundin a kol. 2021) [9]



účinnost testované látky [65]. Jiná studie však docílila proylaktického účinku MEDI3902 v kombinaci s meropenemem v souvislosti s infekcí plic a sepsou způsobené PSAE u králíků [66]. V současné době probíhá celá řada dalších studií, které se soustředí na T3SS jako terapeutický cíl. Pro jejich popis by však byl nutný přehledový článek zabývající se pouze touto problematikou.

Sekreční systém typu V

Tento typ sekrečního systému zprostředkovává transport molekul asociovaných s tvorbou biofilmu, jako jsou EstA nebo fosfolipáza PlpD ("patatin-like protein D"). EstA je autotransportéravá molekula s esterázovou aktivitou. Zvyšuje expresi rhamnolipidů, což má za následek podporu tvorby biofilmu [67].

Fosfolipáza PlpD

Oproti EstA je více charakterizována fosfolipáza PlpD, a proto představuje vhodnější terapeutický cíl [3]. PlpD je enzym s fosfolipázovou aktivitou, umožňující adhérenci bakterie. PlpD je syntetizována jako makromolekula nesoucí tzv. POTRA ("polypeptide transport-associated") doménu a 16-ti vláknový β-barel. Beta-barel s doménou POTRA vykazují vlastnosti TpsB proteinů. Ty jsou asociovány se specializovanými sekrečními systémy TPS u gramnegativních bakterií. TpsB proteiny jsou umístěny ve vnější membráně, specificky rozpoznávají a následně transportují své partnerské proteiny, TspA [68]. Tento TspA region fosfolipázy PlpD hraje zřejmě roli při inhibici růstu bakterií pro udržení optimální hustoty populace v biofilmu [13]. Snadná dostupnost PlpD a její schopnost zvýšit virulenci PSAE prostřednictvím adherence a regulace tvorby biofilmu, činí fosfolipázu PlpD vhodným adeptem pro vývoj inhibitorů. Bohužel však zatím nejsou žádná data o vývoji látek, které by účinně blokovaly přímo PlpD, nebo její transport pomocí inhibice molekul T5SS.

Sekreční systém typu VI

Pomocí T6SS jsou sekretovány FV, jako jsou bakteriolytický protein Tse1-3 hydrolyzující peptidoglykan uplatňující se při bakteriální kompetici a fosfolipáza D (PLD) působící na prokaryotické i eukaryotické buňky [14].

Fosfolipáza D (PldA, PldB)

Jedná se o fosfolipázu se schopností štěpit fosfodiesterové vazby v hlavních komponentech buněčných membrán. Díky své enzymatické aktivitě přispívá k průniku PSAE do epitelialních buněk. PLD fosfolipázy, PldA a PldB, se podílejí také na aktivaci signální dráhy PI3K/Akt, čímž usnadňují invazi PSAE do hostitelských buněk [69,70]. PldA by mohla hrát roli během plicních infekcí, navíc je v kmenech PSAE zřejmě koselektovaná s determinanty rezistence k imipenemu, což prohlubuje význam tohoto FV z hlediska vývoje antivirulentní látky [71]. Přestože kompletní struktura i mechanismus účinku PldA nebyly až donedávna popsány, recentní studii se podařilo odhalit krystalickou strukturu PldA. Vzhledem ke strukturní podobnosti PldA s eukaryotickou fosfolipázou D, lze spekulovat o tom, že PldA je schopna napodobit určité funkce hostitelské PLD. Díky informaci o struktuře tohoto enzymu, lze odvodit mechanismu jak aktivace, tak inhibice PldA [70]. Nicméně vzhledem k teprve nedávnému objevení krystalické struktury PldA lze předpokládat, že identifikace účinných inhibitorů této fosfolipázy ještě bude nějaký čas trvat.

Další možnosti alternativní terapie MDR PSAE

Kromě výše popsaných FV, které jsou využívány jedním z pěti uvedených sekrečních systémů PSAE, jsou další studie zaměřeny na řadu jiných FV pro účely vývoje antivirulentních látek. Například pyoverdin, hlavní siderofor PSAE, reguluje produkci FV sekretovaných systémem T2SS, jako je exotoxin A a proteázy PrpL, které mají devastující účinek na plicní tkáň, a nepřímo indukuje zánětlivou reakci [72]. Pokud by se podařilo inhibovat produkci pyoverdalu, čímž by se zabránilo sekreci dalších navazujících FV, dosáhlo by se významné atenuace toxicity PSAE.

Kromě antivirulentní terapie se v současné době diskutuje také o tzv. anti-QS strategii. V tomto případě se jedná o inhibici exprese molekul systému QS. Po specifické vazbě autoinduktorů na signální molekuly QS se totiž aktivují geny, jejichž exprese je charakteristická pro příslušný patogenní fenotyp PSAE [73]. Anti-QS strategie tedy představuje, podobně jako antivirulentní terapie, nadějnou alternativu v léčbě infekcí způsobených MDR kmeny PSAE.

Závěr

Prohlubování znalostí v oblasti antivirulentní terapie by mohlo vést ke stanovení nové, cílené a efektivní terapie infekcí vyvolaných PSAE. Tato terapie kombinovaná s antibiotickou léčbou může podstatně zesílit účinnost obou podávaných látek, snížit riziko rozvinutí dalšího onemocnění a zásadně minimalizovat riziko rozvoje život ohrožujícího septického šoku. V případě, že by se podařilo zavést nové terapeutické postupy využívající terapii antivirulentních látek, významně by to přispělo ke snížení používání antibakteriálních látek ve zdravotnictví, a tím k minimalizaci jejich selekčního tlaku na vývoj sekundárních mechanismů bakteriální rezistence.

Podpořeno projektem „Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU“, projektem IGA_LF_2023_012 a projektem MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

Literatura

1. World Health Organisaton. Dostupné z: <https://Www.Who.Int/News/Item/27-02-2017-Who-Publishes-List-of-Bacteria-for-Which-New-Antibiotics-Are-Urgently-Needed>.
2. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of Antibiotic Resistance *Pseudomonas Aeruginosa* in Intensive Care Unit; a Critical Review. *Genes Dis.* 2019;6:109–119.
3. Proctor LL, Ward WL, Roggy CS, et al. Potential Therapeutic Targets for Combination Antibody Therapy against *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Antibiotics* 2021;10:1–31.

4. Horna G, Ruiz J. Type 3 Secretion System as an Anti-Pseudomonas Target. *Microb. Pathog.* 2021;155:104907.
5. Massai F, Saleeb M, Doruk T, et al. Development, Optimization, and Validation of a High Throughput Screening Assay for Identification of Tat and Type II Secretion Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:250.
6. Swietnicki W, Czarny A, Antkowiak L, et al. Identification of a Potent Inhibitor of Type II Secretion System from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 513:688–693.
7. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:1–37.
8. Bleves S, Viarre V, Salacha R, et al. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas Aeruginosa*: A Wealth of Pathogenic Weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010;300:534–543.
9. Sundin C, Saleeb M, Spjut S, et al. Identification of Small Molecules Blocking the *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System Protein Perv. *Biomolecules* 2021;11:1–17.
10. Diepold A, Armitage JP. Type III Secretion Systems: The Bacterial Flagellum and the Injectisome. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015; 370(1679):20150020.
11. Filloux A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas Aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* 2011; 2:1–21.
12. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ. The Type II Secretion System: Biogenesis, Molecular Architecture and Mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:336–351.
13. Da Mata Madeira PV, Zouhir S, Basso P, et al. Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type v Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2016;428:1790–1803.
14. Liao C, Huang X, Wang Q, et al. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:1–17.
15. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In *Pathophysiological Aspects of Proteases*; Chakraborti S, Dhalla NS, Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2017; pp 381–397.
16. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* 2012;188:386–393.
17. Bardoel BW, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG, et al. Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence: Characterization of the AprA-AprI Interface and Species Selectivity. *J. Mol. Biol.* 2012;415:573–583.
18. Mateu-Borrás M, González-Alsina A, Doménech-Sánchez A, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Adaptation in Cystic Fibrosis Patients Increases C5a Levels and Promotes Neutrophil Recruitment. *Virulence* 2022;13:215–224.
19. Jing C, Liu C, Liu Y, et al. Antibodies Against *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease Directly Enhance Disruption of Neutrophil Extracellular Traps Mediated by This Enzyme. *Front. Immunol.* 2021;12:1–16.
20. Paračková Z, Kayserová J, Šedivá A. Neutrofilní extracelulárni pasti - záchranné sítě imunitního systému. *Alergie* 2017;19:33–40.
21. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004;303:1532–1535.
22. Park Y, Koo SH. Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect. Drug Resist.* 2022;15:141–151.
23. Hassuna NA, Mandour SA, Mohamed ES. Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* in Upper Egypt. *Infect. Drug Resist.* 2020;13:587–595.
24. Hirakawa H, Kimura A, Takita A, et al. Adsorption of Extracellular Proteases and Pyocyanin Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Using a Macroporous Magnesium Oxide-Templated Carbon Decreases Cytotoxicity. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2022;3:100160.
25. Hirakawa H, Suzue K, Uchida M, et al. Macroporous Magnesium Oxide-Templated Carbon Adsorbs Shiga Toxins and Type III Secretory Proteins in Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*, Which Attenuates Virulence. *Front. Microbiol.* 2022;13:883689.
26. Vermilyea DM, Crocker AW, Gifford AH, et al. Calprotectin-Mediated Zinc Chelation Inhibits *Pseudomonas Aeruginosa* Protease Activity in Cystic Fibrosis Sputum. *J. Bacteriol.* 2021;203(13):e0010021.
27. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, et al. VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas Aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10:1–17.
28. Galdino ACM, Viganor L, De Castro AA, et al. Disarming *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phe-nanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target. *Front. Microbiol.* 2019;10:1–16.
29. Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska DM, et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, Genes Coding Virulence Factors and Source of Origin of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2021;28:306–313.
30. Bastaert F, Kheir S, Saint-Criq V, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering with Bacterial Killing through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Front. Immunol.* 2018;9:1–18.
31. Sun J, LaRock DL, Skowronski EA, et al. The *Pseudomonas Aeruginosa* Protease LasB Directly Activates IL-1 β . *EBioMedicine* 2020;60: 102984.
32. Yu H, He X, Xie W, et al. Elastase LasB of *Pseudomonas Aeruginosa* Promotes Biofilm Formation Partly through Rhamnolipid-Mediated Regulation. *Can. J. Microbiol.* 2014;60:227–235.
33. Casilag F, Lorenz A, Krueger J, et al. LasB Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA to Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* 2015;84: 162–171.
34. Everett MJ, Davies DT. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase (LasB) as a Therapeutic Target. *Drug Discov. Today* 2021;26:2108–2123.
35. Kaya C, Walter I, Alhayek A, et al. Structure-Based Design of α -Substituted Mercaptoacetamides as Inhibitors of the Virulence Factor LasB from *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 2022;8,1010–1021.
36. Yahiaoui S, Voss K, Haupenthal J, et al. N-Aryl Mercaptoacetamides as Potential Multi-Target Inhibitors of Metallo- β -Lactamases (MBLs) and the Virulence Factor LasB From *Pseudomonas Aeruginosa*. *RSC Med. Chem.* 2021;12:1698–1708.
37. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: Optimized by Evolution for Effective Killing. *Front. Microbiol.* 2015;6:1–7.
38. Pinilla M, Mazars R, Vergé R, et al. EEF2-Inactivating Toxins Engage the NLRP1 Inflammasome and Promote Epithelial Barrier Disruption upon *Pseudomonas* Infection. *bioRxiv* 2023, 2023.01.16.524164.
39. Santajit S, Seesuay W, Mahasongkram K, et al. Human Single-Chain Antibodies That Neutralize *Pseudomonas Aeruginosa*-Exotoxin A-Mediated Cellular Apoptosis. *Sci. Rep.* 2019;9:1–15.
40. Bezzerri V, d'Adamo P, Rimessi A, et al. Phospholipase C-B3 Is a Key Modulator of IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *J. Immunol.* 2011;186:4946–4958.
41. Wargo M.J, Gross MJ, Rajamani S, et al. Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184:345–354.
42. Wolfmeier H, Wardell SJT, Liu LT, et al. Targeting the *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor Phospholipase C With Engineered Liposomes. *Front. Microbiol.* 2022;13:867449.
43. Susilowati H, Artanto S, Yulianto HDK, et al. The Protective Effects of Antigen-Specific IgY on Pyocyanin-Treated Human Lymphoma Raji Cells. *Wellcome Open Res.* 2019;4:1–12.
44. Rada B, Jendrysik MA, Pang L, et al. Pyocyanin-Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation Requires the NADPH Oxidase. *PLoS One* 2013;8(1):e54205.
45. Zhang Y, Faucher F, Zhang W, et al. Structure-Guided Disruption of the Pseudopilus Tip Complex Inhibits the Type II Secretion in *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2018;14:1–27.
46. Swietnicki W, Czarny A, Urbanska N, et al. Identification of Small Molecule Compounds Active against *Staphylococcus Aureus* and *Proteus Mirabilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;506: 1047–1051.
47. Kloth C, Schirmer B, Munder A, et al. The Role of *Pseudomonas Aeruginosa* Exoy in an Acute Mouse Lung Infection Model. *Toxins (Basel)*. 2018;10:1–15.
48. Rangel SM, Diaz MH, Knoten CA, et al. The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas Aeruginosa* during Pneumonia. *PLoS Pathog.* 2015;11:1–27.

49. Kroken AR, Kumar NG, Yahr TL, et al. Exotoxin S Secreted by Internalized *Pseudomonas Aeruginosa* Delays Lytic Host Cell Death. *PLoS Pathog.* 2022;18:1–28.
50. Horna G, Amaro C, Palacios A, et al. High Frequency of the ExoU+/ExoS+ Genotype Associated with Multidrug-Resistant “High-Risk Clones” of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates from Peruvian Hospitals. *Sci. Rep.* 2019;9:1–13.
51. Pinto AF, Ebrahimi M, Saleeb M, et al. Identification of Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin-S ADP-Ribosyltransferase Activity. *J. Biomol. Screen.* 2016;21:590–595.
52. Cao J, Xie Z, Zhang Y, et al. Ibuprofen Suppresses the Expression of ExoS Secreted by *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System in Vitro. *Acta Medica Mediterr.* 2022;38:8.
53. Sato H, Frank DW. ExoU Is a Potent Intracellular Phospholipase. *Mol. Microbiol.* 2004;53:1279–1290.
54. Allewelt M, Coleman FT, Grout M. Acquisition of Expression of the *Pseudomonas Aeruginosa* ExoU Cytotoxin Leads to Increased Bacterial Virulence in a Murine Model of Acute Pneumonia and Systemic Spread. *Infect. Immun.* 2000;68:3998–4004.
55. Hardy KS, Tuckey AN, Renema P, et al. ExoU Induces Lung Endothelial Cell Damage and Activates Pro-Inflammatory Caspase-1 during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Toxins (Basel)*. 2022;14:1–19.
56. Halavaty AS, Borek D, Tyson GH, et al. Structure of the Type III Secretion Effector Protein ExoU in Complex with Its Chaperone SpeU. *PLoS One* 2012;7(11):e49388.
57. Phillips RM, Six DA, Dennis EA, et al. In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas Aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2003;278:41326–41332.
58. Sato H, Feix JB, Frank DW. Identification of Superoxide Dismutase as a Cofactor for the *Pseudomonas* Type III Toxin, ExoU. *Biochemistry* 2006;45:10368–10375.
59. Stirling FR, Cuzick A, Kelly SM, et al. Eukaryotic Localization, Activation and Ubiquitylation of a Bacterial Type III Secreted Toxin. *Cell. Microbiol.* 2006;8:1294–1309.
60. Foulkes DM, McLean K, Haneef AS, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms* 2019;7:11–13.
61. Foulkes DM, McLean K, Zheng Y, et al. A Pipeline to Evaluate Inhibitors of the *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin U. *Biochem. J.* 2021;478:647–668.
62. Moriyama K, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Protective Effects of Affinity-Purified Antibody and Truncated Vaccines against *Pseudomonas Aeruginosa* V-Antigen in Neutropenic Mice. *Microbiol. Immunol.* 2009;53:587–594.
63. Jain R, Beckett VV, Konstan MW, et al. KB001-A, a Novel Anti-Inflammatory, Found to Be Safe and Well-Tolerated in Cystic Fibrosis Patients Infected with *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Cyst. Fibros.* 2018;17:484–491.
64. Ali SO, Yu XQ, Robbie GJ, et al. Phase 1 Study of MEDI3902, an Investigational Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* PcrV and Psl Bispecific Human Monoclonal Antibody, in Healthy Adults. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25:e629.e1–e629.e6.
65. Chastre J, François B, Bourgeois M, et al. Efficacy, Pharmacokinetics (PK), and Safety Profile of MEDI3902, an Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Bispecific Human Monoclonal Antibody in Mechanically Ventilated Intensive Care Unit Patients; Results of the Phase 2 EVADE Study Conducted by the Public. *Open Forum Infect. Dis.* 2020;7:S377–S378.
66. Le HN, Tran VG, Vu TTT, et al. Treatment Efficacy of MEDI3902 in *Pseudomonas Aeruginosa* Bloodstream Infection and Acute Pneumonia Rabbit Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019;63:3–7.
67. Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al. The Autotransporter Esterase Esta of *Pseudomonas Aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2007;189:6695–6703.
68. Cai X, Wang R, Filloux A, et al. Structural and Functional Characterization of *Pseudomonas Aeruginosa* CupB Chaperones. *PLoS One* 31;6(1):e16583.
69. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, et al. A *Pseudomonas Aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host Microbe* 2014;15:600–610.
70. Yang X, Li Z, Zhao L, et al. Structural Insights into PA3488-Mediated Inactivation of *Pseudomonas Aeruginosa* PldA. *Nat. Commun.* 2022;13:1–13.
71. Boulant T, Boudehen YM, Filloux A, et al. Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas Aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front. Microbiol.* 2018;9:1–7.
72. Kang D, Kirienko VN. *Pseudomonas Aeruginosa* Siderophores Damage Lung Epithelial Cells and Promote Inflammation. *bioRxiv Prepr.* 2023.01.26.525796.
73. Papenfort K, Bassler BL. Quorum Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14:576–588.