

University of Groningen

Quorum Sensing inhibition to battle infectious diseases

Vogel, Jan

DOI:
[10.33612/diss.223720831](https://doi.org/10.33612/diss.223720831)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Vogel, J. (2022). *Quorum Sensing inhibition to battle infectious diseases*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.223720831>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

8

Samenvatting

Antibiotica crisis – Terug naar het begin

Een beroemd citaat van Charles Darwin luidt: “Het is niet de sterkste van de soort die overleeft, niet de intelligentste die overleeft, het is degene die zich het beste aanpast aan veranderingen.” Voor de menselijke soort is het concept van evolutie misschien moeilijk te vatten, omdat het tijdsbestek van aanpassing door natuurlijke selectie zo groot is dat het bijna onmogelijk is om in een mensenleven waar te nemen. Elk levend wezen evolueert echter, past zich voortdurend aan de veranderingen van de omgeving aan. Dit geldt zowel voor mensen als voor bacteriën. Bacteriën passen zich voortdurend aan, ook aan veranderingen die door de mens zijn veroorzaakt. Met de ontdekking van antibiotica hebben farmaceuten krachtige verbindingen gevonden, aangepast en verfijnd om bacteriën efficiënt te doden. Het overmatig gebruik van antibiotica zal echter deze middelen op den duur nutteloos maken, zoals we nu al kunnen waarnemen. Tegen waarschuwingen in worden antibiotica nog steeds onzorgvuldig gebruikt en in grote hoeveelheden in het milieu gebracht. En zoals we dagelijks kunnen waarnemen, zijn pathogene bacteriën aangepast aan de omgeving veranderd door het antibioticum. Het wordt beschreven als “antibiotische vervuiling”, antibiotica kunnen worden gevonden in door de mens gemaakte omgevingen zoals riolen en afvalwaterzuivering, maar antibioticamoleculen worden ook gevonden in natuurlijke zoetwateromgevingen en kunnen ook worden gedetecteerd in het grondwater [253]. De som van de wereldwijde antibioticacconsumptie bestaat niet alleen uit het gebruik in de menselijke geneeskunde, maar ook uit vele andere sectoren van commerciële activiteiten zoals landbouw. Alleen al in de VS schatte de Food and Drug Administration in 2010 dat 80% van de jaarlijkse antimicrobiële consumptie wordt gebruikt voor ziektebestrijding en groeibevordering van voedseldieren [1].

De wereldwijde consumptie van antibiotica voor veeteelt wordt geschat op meer dan 65.000 ton per jaar en deze trend neemt toe [254]. Als we een oplossing zoeken voor de wereldwijde antibiotica-crisis, is het misschien niet voldoende om alleen nieuwe antibiotica te ontwikkelen, maar dit moet hand in hand gaan met strengere regelgeving en modern beleid voor het gebruik van bestaande en nieuwe antibiotica. Meer dan dat is het uiterst belangrijk om het grote publiek te sensibiliseren en voor te lichten over het gebruik van antibiotica en de behandeling met antibiotica in het algemeen.

De toekomst van “quorum quenching” als behandeling

De kolonisatie van de menselijke huid en het darmkanaal met “nut-tige bacteriën” is een integraal onderdeel van een gezond menselijk

lichaam. We leven in een symbiotische co-existentie met het microbiële ecosysteem in ons lichaam. Onnodig te zeggen dat de verstoring van dit ecosysteem ook onze gezondheid bedreigt. Enzymatisch "quorum quenching" (QQ) gemedieerd door PvdQ richt zich alleen op AHL's met een lange keten, dit maakt het mogelijk om zich specifiek te richten op pathogene bacteriën, die met dit signaal communiceren en de "nuttige" bacteriën intact te laten.

In **Hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat enzymatische QQ inderdaad een hoge mate van selectiviteit vertoont in tegenstelling tot conventionele antibiotica. Dit is mogelijk door speciale auto-inductoren, die door pathogenen worden gebruikt, direct aan te pakken en de zo impact op het darm microbioom zo laag mogelijk te houden [255]. AHL-moleculen kunnen verschillen in hun ketenlengte en ook in modificatie aan hun derde koolstofatoom. De resulterende verschillen kunnen worden beschouwd als verschillende dialecten van dezelfde taalfamilie. Enzymatische QQ biedt de mogelijkheid om zich alleen op een speciale reeks AHL's en dienovereenkomstig specifiek op pathogene bacteriën te richten.

Een mogelijke directe impact van QQ op de menselijke gastheer is de bevinding dat AHL's worden herkend door het immuunsysteem en bijvoorbeeld werken als chemolokkers voor neutrofielen. Ze werken als immuun stimuli op dezelfde manier als bijvoorbeeld glycolipiden, extern DNA en LPS [256]. Verder is van AHL's bekend dat ze pro-apoptotische en pro-inflammatoire reacties geven in eukaryote cellen [255]. Zoals hierboven al beschreven, biedt enzymatische QQ een hoge specificiteit voor AHL's als substraten. In het geval van het acylase PvdQ, zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**, richt het enzym zich vooral op AHL's met een lange keten, die worden gebruikt door Gram-negatieve pathogenen zoals *P. aeruginosa* en *A. baumannii*. AHL's met een kortere keten blijven onaangetast en functioneren nog steeds als auto-inducerende moleculen en als belangrijke signalen voor het menselijke immuunsysteem. De hoge specificiteit van PvdQ staat voor een gerichte aanpak tegen specifieke AHL's.

Als we echter kijken naar AHL-lactonases, die de esterbinding van de homoserine-lactonring splitsen en weinig interactie hebben met de acylzijketen, dan kunnen die worden beschreven als "breed bereik" QQ-enzymen [257]. Dat betekent dat deze lactonases veel verschillende AHL's afbreken met verschillende ketenlengtes en modificaties. Dienovereenkomstig zijn lactonases mogelijk vatbaarder voor het induceren van de hierboven beschreven bijwerkingen, aangezien ze mogelijk kunnen interfereren met het QS-systeem van nuttige bacteriën. Dat betekent dat een meer specifieke QQ-aanpak, zoals getoond voor PvdQ, gunstig zou zijn in dit scenario en mogelijke negatieve effecten van QQ zou verminderen.

Voor een verdere evaluatie van QS-remming als behandelstrategie is het noodzakelijk om na te denken over het ontstaan van resistentie.

In gemengde bacteriële populaties kunnen individuele bacteriën baat hebben bij voedingsstoffen die beschikbaar worden gesteld door uitgescheiden enzymen van andere bacteriën. Dit fenomeen wordt sociaal bedrog genoemd. Een illustratief voorbeeld is de uitscheiding van de siderofoor pyoverdine van *P. aeruginosa*. Deze verbinding wordt als een publiek goed beschouwd, omdat het door cellen kan worden opgenomen, zelfs als ze niet in staat zijn om het zelf te produceren [255]. Dit betekent dat zelfs als er mutaties optreden die het QS-systeem onder die omstandigheden kunnen herstellen, ze geen selectief voordeel zouden hebben vanwege het sociale bedrog van bacteriën in gemengde populaties. Dit zou kunnen betekenen dat resistentie zich mogelijk niet op dezelfde manier verspreidt als wanneer de cellen worden uitgedaagd met conventionele antibiotica. Een factor die in bijna alle beschikbare publicaties wordt verwaarloosd, is het feit dat elke vorm van behandeling uiteindelijk de bacteriële evolutionaire fitheid beïnvloedt. Het uiteindelijke doel is immers om de infectie te verwijderen en de bacteriële belasting in het gastheersysteem te verminderen. Tot dusverre zijn in vivo diermodellen de enige benadering om de potentie van QQ-behandelingen daadwerkelijk te beoordelen. Publicaties getuigen van het gunstige effect van enzymatische QQ in modellen van ongewervelde dieren, muizen en ratten [35,36]. Tegen deze achtergrond lijkt QQ een milde benadering om infecties te beheersen. Bovendien kunnen in de nabije toekomst combinatiebehandelingen van QQ en conventionele antibiotica een realistische benadering zijn om infectieziekten te bestrijden.

Acinetobacter baumannii

Zoals besproken in **Hoofdstuk 5**, stellen we een combinatiebehandeling voor van het QQ-acylase PvdQ en gentamicine om de bacteriële biofilm van *Acinetobacter baumannii* te bestrijden. Ten eerste hebben we, rekening houdend met de specificiteit van PvdQ, getest of het enzym onderscheid maakt tussen AHL met lange keten met een oxo- en een hydroxy-modificatie op het derde koolstofatoom bij de amide binding. Deze wijziging lijkt geen enkele invloed te hebben op de herkenning van de autoinducer door het enzym. Volgens het huidige begrip van het QS-systeem van *A. baumannii* ATCC 17978 hangt de biofilm-vorming samen met het QS-systeem. We kunnen inderdaad een significante vermindering van biofilm-vorming waarnemen na PvdQ-behandeling. Daarnaast hebben we beoordeeld of klinische isolaten van *A. baumannii* ook reageren op dezelfde behandeling en hebben we vastgesteld dat de toevoeging van het enzym leidt tot een vermindering van de biofilm in meer dan 70% van de isolaten. Vervolgens hebben we de biofilm-vorming van *A. baumannii* ATCC 17978 met en zonder PvdQ-voorbehandeling en in combinatie met

gentamicine beoordeeld. We konden aantonen dat de levensvatbare cellen in de biofilm met de PvdQ/Gentamicine-combinatie met 50% werden verminderd in vergelijking met een behandeling met alleen het antibioticum. Ten slotte konden we bevestigen dat een QQ-behandeling met PvdQ de overleving van *G. mellonella* in een infectiemodel verlengde. Hoewel dit slechts observaties zijn in een infectiemodel, is het gunstige effect van de QQ-behandeling evident.

Geïmmobiliseerde acylases

Ook kunnen in de klinische omgeving QQ-strategieën worden toegepast zoals getoond in **Hoofdstuk 4**. We hebben het acylase PvdQ elektrostatich geïmmobiliseerd op PDMS-siliconen en de aanhechting van *P. aeruginosa*-cellen geëvalueerd. De kolonisatie van abiotische oppervlakken door bacteriën is alomtegenwoordig in door mensen gemaakte omgevingen en we kunnen overal aan het oppervlak gehechte bacteriën vinden, van het internationale ruimtestation tot nosocomiale omgevingen [258]. Vooral in de laatste omgeving is dit problematisch en het medisch personeel doet er alles aan om kamers en apparatuur zo steriel mogelijk te houden. Ondanks al het harde werk kunnen pathogenen zoals *P. aeruginosa* echter wereldwijd worden geïsoleerd uit IC-eenheden. Vooral interne medische hulpmiddelen worden beschouwd als een toegangspoort voor pathogene bacteriën in het menselijk lichaam. Ook gesteriliseerde medische artikelen zoals katheters zullen uiteindelijk worden gekoloniseerd en fungeren als een reservoir voor urineweginfecties. De standaard procedure is in dit geval de reguliere uitwisseling en vervanging. Maar dit veroorzaakt normaal gesproken een ongemak voor de patiënt en kan ook kleine verwondingen veroorzaken die op hun beurt het menselijk lichaam kwetsbaar maken voor bacteriële infecties. In dit werk konden we laten zien dat we PvdQ inderdaad kunnen toepassen op het oppervlak van PDMS. Met FITC-gelabeld PvdQ kon worden aangetoond dat het gelijkmatig op de siliconen werd afgezet. Het enzym behield zijn activiteit vanwege de milde omstandigheden voor immobilisatie, zoals we konden bewijzen door een biosensor AHL-activiteitstest. Tenslotte onthulde een kleuring van de aangehechte *P. aeruginosa*-cellen dat inderdaad de initiële aanhechting significant was verminderd. Concluderend hebben we aangetoond dat het mogelijk is om een geactiveerd oppervlak te creëren dat AHL's actief afbreekt en bijgevolg de QS-gemedieerde aanhechting van *P. aeruginosa* PAO1 vermindert. Geactiveerde oppervlakken kunnen ook worden toegepast bij gewrichts vervangingen als preventieve maatregel tegen gewrichtsprothese-infecties (PJI). De bacteriële biofilm is een belangrijke factor in de pathogenese van PJI's, die ongeveer 1 tot 4% uitmaken na primaire totale knie-artroplastiek en 1 tot 2% na

primaire totale heup-artroplastiek [259]. Een veelgebruikte managementstrategie tegen PJI's is met antibiotica beladen acrylcement, maar een groot nadeel is het feit dat gemiddeld slechts 10% van de totale beladen antibiotica vrijkomt en dit kan leiden tot lage sub-remmende concentraties. In combinatie met de oppervlaktekolonisatie van de implantaten kan dit de vorming van bacterieresistentie versterken [96]. In dit scenario zou geïmmobiliseerd PvdQ een aanvullende behandelingsoptie kunnen bieden door de initiële hechting van bacteriën aan het oppervlak van het implantaat te remmen en bijgevolg de tolerantie voor antibiotica van de planktoncellen te verlagen.

Remming van PvdQ

In **hoofdstuk 7** nemen we een andere benadering om de virulentiefactoren van *P. aeruginosa* te verminderen. Zoals besproken in hoofdstuk 3, speelt PvdQ een integrale rol in de rijping van de siderofoor pyoverdine. De lage biologische beschikbaarheid van ijzer voor biologische processen in het milieu en in gastheerorganismen creëert de noodzaak voor bacteriën voor zeer efficiënte ijzeropnamesystemen. Logischerwijs interfereren met de microbiële ijzerhomeostase kan een doelwit zijn tegen pathogene bacteriën. In dit deel werd een bibliotheek van 81 op chromeen gebaseerde remmers tegen PvdQ gescreend. De krachtigste remmer vertoonde een $IC_{50} = 4,70 \pm 0,51 \mu M$. De geïdentificeerde remmer **4d** zou de productie van pyoverdine op een dosisafhankelijke manier kunnen doven. Bovendien kon de potentie van de verbinding worden geëvalueerd in een **G. mellonella**-infectie-model dat werd beproefd met PAO1.

Conclusie

Van enzymatische QQ is bewezen dat het de productie van virulentiefactoren aanzienlijk vermindert en als een managementinstrument dient tegen biofilm-vorming en oppervlaktehechting in vitro. Ook bevestigden dierproeven het positieve effect van QQ-enzymen in vivo. Het potentieel van QQ-enzymen is sterk afhankelijk van de medische context, bijvoorbeeld de plaats van toediening en de wijze van toediening. Vooral in tijden van stijgende aantallen MDR-infecties zijn alternatieve behandelingsopties van groot belang. Met name bij de behandeling van chronische infecties, die langdurige medicatie vereisen, kan enzymatische QQ een alternatief of aanvulling zijn op conventionele antibiotica, aangezien QQ minder selectieve druk uitoefent op pathogenen. Het is in dit verband belangrijk om te benadrukken dat het doel van deze behandeling is om virulentiefactoren te verminderen en de vorming van biofilms te belemmeren. De klaring

van de infectie zal worden uitgevoerd door het immuunsysteem van de gastheer of met behulp van antibacteriële verbindingen. Een interessante toepassing van QQ-enzymen zou de functionalisering van verschillende medisch relevante oppervlakken kunnen zijn om antibiofilm-eigenschappen te mediëren. We hebben in dit werk aangetoond dat het QQ-enzym PvdQ inderdaad het potentieel heeft om in vitro en in vivo te worden gebruikt tegen infecties met *A. baumannii* en *P. aeruginosa*. Het potentieel van QQ-enzymen rechtvaardigt om meer inspanningen te leveren in onderzoek en verfijning van deze techniek en uiteindelijk zouden QQ-behandelingsbenaderingen een krachtig hulpmiddel kunnen zijn om bacteriële infecties in de toekomst te bestrijden.