

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Geschat wordt dat ongeveer 20-30% van de bevolking drager is van *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), een Gram-positief micro-organisme. *S. aureus* kan een breed scala aan infecties veroorzaken, variërend van milde huidinfecties, tot ernstige, diep gelegen weefselinfecties, endocarditis en sepsis. Tot op heden is er geen functioneel vaccin beschikbaar en met de opkomst van antibioticaresistente bacteriën wordt het behandelen van stafylokokken-gerelateerde infecties steeds moeilijker. Door deze ontwikkelingen is er in toenemende mate behoefte aan alternatieve behandelingsstrategieën.

S. aureus bezit een groot aantal virulentiefactoren, die een belangrijke rol spelen in de succesvolle totstandkoming van een infectie. Een belangrijke groep virulentiefactoren zijn de celwand geassocieerde (CWA)-eiwitten. CWA-eiwitten, die covalent zijn verankerd in de peptidoglycaan-laag (PG-laag) van de bacterie, spelen een rol bij de aanhechting van *S. aureus* aan weefsel en cellen, de invasie in epitheelcellen of bij het ontwijken van het immuunsysteem. Ondanks hun grote functionele en structurele diversiteit bezitten alle CWA-eiwitten in hun C-terminale deel een LPXTG motief dat door het enzym sortase A (SrtA) wordt gebruikt om CWA-eiwitten in de PG-laag van de bacterie te verankeren.

In dit proefschrift is onderzocht of SrtA gebruikt kan worden voor o.a. celwandmodificaties en antimicrobiële toepassingen.

De doelstellingen van dit proefschrift waren drievoudig. Ten eerste het ontwikkelen en optimaliseren van synthetische LPXTG-bevattende moleculen die door bacterieel SrtA worden ingebouwd in de celwand van *S. aureus*. Ten tweede het exploreren van mogelijke antimicrobiële toepassingen van LPXTG-bevattende moleculen als platform voor antimicrobiële middelen. Ten derde het onderzoeken in hoeverre de inbouw van natuurlijke CWA-eiwitten beïnvloed wordt door LPXTG-bevattende moleculen.

In **hoofdstuk 2** is het ontwikkelen van een bead-based multiplex assay beschreven die met behulp van antilichamen de detectie van meerdere bacteriële oppervlaktestructuren tegelijkertijd mogelijk maakt. Met deze methode is de groeifasen afhankelijke expositie van CWA-eiwitten en suikerstructuren van *S. aureus* in verschillende stammen onderzocht.

De expositie van een aantal CWA-eiwitten aan het oppervlak van o.a. *S. aureus* wild type (WT), een *srtA* deletie mutant (KO) en een selectie van bacteriëmie-isolaten is met deze methode bestudeerd. De data laten zien, dat er CWA-eiwitten in de *S. aureus srtA* KO stam aanwezig zijn maar dat deze niet-covalent gebonden zijn aan de bacteriële cel; en dat de klinische isolaten heterogene expressie vertonen van CWA-eiwitten en suikerstructuren aan hun oppervlak. Deze methode is zeer bruikbaar voor de initiële karakterisatie van bacteriële oppervlakken en kan op deze manier mogelijk een bijdrage leveren aan vaccinontwikkeling. De optimalisatie van een bead-based multiplex assay met behulp van magnetische beads is beschreven in **hoofdstuk 3**; deze optimalisatie resulteerde in verbeterde assay-prestaties

en de detectie van antilichamen met een lage titer die mogelijk gemist zijn met de non-magnetische beads. Deze geoptimaliseerde magnetische-bead-based assay kan inzichten geven in de humorale response in verschillende fases van een bacteriële infectie.

In **hoofdstuk 5** werd de inbouw van een fluorescent gelabeld synthetisch SrtA substraat, FITC-LPETG, bestudeerd in de PG-laag van *S. aureus* (MSSA en MRSA) en in verschillende andere Gram-positieve stammen, zoals *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) en *Streptococcus agalactiae*. Met behulp van op fluorescentie gebaseerde detectiemethoden werd de covalente inbouw van FITC-LPETG SrtA synthetisch substraat aangetoond in WT *S. aureus* stammen en *E. faecium* species. Dat de substraten SrtA afhankelijk worden ingebouwd, valt af te leiden uit het feit dat dit 1) niet plaats vond in de isogene *S. aureus srtA* KO stam, 2) was geremd met behulp van hydroxylamine, en 3) dat het controlesubstraat, FITC-EGTLP, niet werd ingebouwd in de WT stam en de *srtA* KO stam.

Om de inbouwefficiëntie van de SrtA substraten te verhogen werd er in **hoofdstuk 6**, gebaseerd op de structuur van een fysiologisch CWA-eiwit, een aantal SrtA substraten ontworpen en hun inbouwefficiëntie geëvalueerd. Een substraat waarin het LPETG motief was gecombineerd met een positief geladen domein gaf een 20-voudige hogere inbouw dan het FITC-LPETG substraat. Door het sortase herkenningsmotief te koppelen aan vancomycine werd een variant verkregen die bij een 500 keer lagere concentratie dezelfde inbouw vertoonde als het FITC-LPETG substraat. Deze gegevens suggereren dat het endogene SrtA enzym diverse exogene substraten met verschillende efficiëntie in de PG-laag kan inbouwen.

In de **hoofdstukken 5 en 6** is onderzocht in hoeverre dergelijke synthetische substraten de inbouw van fysiologische substraten (de CWA-eiwitten) beïnvloeden. Dit bleek niet het geval te zijn; beide substraten werden naast elkaar ingebouwd. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat synthetische en fysiologische substraten via verschillende routes worden ingebouwd door SrtA. In **hoofdstuk 7** is onderzocht in hoeverre lipide II, die als primaire acceptor fungeert bij de inbouw van fysiologische substraten door sortase, ook een rol speelt bij de inbouw van synthetische substraten. Remming van de recycling van lipide II door bacitracine, resulteerde zoals verwacht in een lagere inbouw van proteïne A, een fysiologisch SrtA substraat. Onder deze condities werden echter juist meer synthetische substraten ingebouwd. Dit is een sterke aanwijzing dat beide type substraten langs verschillende routes door SrtA worden ingebouwd in de celwand. Dit suggereert dat de SrtA synthetische substraten direct aan de vrije pentaglycines binnen de PG-laag gekoppeld worden.

Gebaseerd op de bevindingen gepresenteerd in de **hoofdstukken 5-7** is een alternatief model opgesteld dat de incorporatie van synthetische SrtA substraten in *S. aureus* PG beschrijft (General discussion, Figuur 1): SrtA synthetische substraten worden (i) verwerkt door de endogene SrtA (**hoofdstukken 5-7**) (ii) samengevoegd tot een thio-ester enzym tussenvorm, (**hoofdstuk 5**) en (iii) vervolgens direct, in een lipide II onafhankelijke route, covalent gekoppeld aan beschikbare pentaglycines in PG (**hoofdstuk 7**).

De in dit proefschrift beschreven synthetische substraten kunnen op velerlei gebieden toegepast worden. Te denken valt aan *in situ* imaging van bacteriën en als platform voor de ontwikkeling van een nieuwe generatie antimicrobiële middelen.