

# Quorum sensing inhibitie van *Pseudomonas aeruginosa* als ontstekingsremmer tegen brandwond infecties

Simone V. Lip, Bastiaan P. Krom  
Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, Nederland.

## Samenvatting

Er worden tegenwoordig veel manieren onderzocht om infecties te bestrijden. Het remmen van quorum sensing (QS) is hier een voorbeeld van. Bacteriën gebruiken QS om onderling te communiceren. Op deze manier kunnen ze als het ware samenwerking waardoor ze een sterkere infectie kunnen veroorzaken. De uitgescheiden moleculen betrokken bij QS hebben ook effecten op cellen van de gastheer. Onder andere de cellen van het immuunsysteem worden aangetast waardoor de immunrespons wordt verslechterd. Met name het signaal molecuul 3-oxo-C12-HSL is voor verschillende eukaryote cellen een immunomodulator en de productie van dit QS molecuul speelt een hele grote rol bij de pathogenese van *Pseudomonas aeruginosa*. Om deze infecties te bestrijden of af te zwakken, kan gekeken worden naar het remmen van QS. Dit kan gedaan worden het remmen van de aanmaak van QS moleculen, het afbreken ervan of door het toevoegen van antagonisten van de QS moleculen. De virulentie van bacteriën neemt hierdoor sterk af en de effecten van de QS moleculen op nabijgelegen cellen van de gastheer worden weggenomen. Hierdoor wordt de immunrespons van de gastheer niet meer beïnvloed waardoor de immunrespons sneller en sterker zal optreden waardoor de infectie beter te bestrijden is door de gastheer zelf.

## Inhoudsopgave

Samenvatting.....	1
Inhoudsopgave .....	1
Inleiding .....	2
Hoofdstuk 1: Quorum Sensing .....	3
Hoofdstuk 2: De verschillende QS moleculen van <i>P. aeruginosa</i> en hun functies.....	3
Hoofdstuk 3: Celtypes binnen een brandwond.....	5
Hoofdstuk 4: Het effect van QS moleculen op de verschillende cellen binnen een brandwond .....	6
Hoofdstuk 5: QS inhibitie in <i>P. aeruginosa</i> .....	9
Conclusie en speculaties .....	12
Literatuurlijst .....	12

## Inleiding

Er worden steeds meer manieren ontwikkeld voor het bestrijden van bacteriële infecties. Toch is het nog niet gelukt om één methode te vinden om elke infectie tegen te gaan. Deze literatuurstudie gaat over een nieuwe methode van infectiebestrijding, namelijk door het remmen van quorum sensing.

Communicatie is van groot belang voor overleving, reproductie en samenwerking. Zo blijkt dat ook het geval voor bacteriën te zijn. De manier van communiceren van bacteriën wordt quorum sensing genoemd en gebeurt door middel van het uitscheiden en detecteren van chemische moleculen. De bacteriën kunnen op deze manier hun fenotype aanpassen aan hun omgeving, wat voor een grotere overlevingskans en de mogelijkheid tot samenwerking zorgt (Miller & Bassler, 2001). Maar, het blijkt dat niet alleen bacteriën gevoelig zijn voor deze uitgescheiden moleculen. Ze hebben namelijk ook invloed op andere nabij gelegen cellen van de gastheer.

Het immuunsysteem van de gastheer is verantwoordelijk voor het bestrijden van infecties. Maar, aangezien quorum sensing moleculen ook een effect hebben op cellen van de gastheer en dus ook op cellen van het immuunsysteem, blijkt het zo te zijn dat deze chemische moleculen de immuunrespons van de gastheer verslechterd, waardoor de infectie slechter bestreden kan worden, waardoor de bacterie op zijn beurt weer een grotere overlevingskans heeft. Door de communicatie tussen bacteriën te remmen, zouden de negatieve effecten van de uitgescheiden chemische moleculen verdwijnen. In dit literatuuronderzoek wordt de hypothese gesteld dat het remmen van quorum sensing een ontstekingsremmend resultaat kan veroorzaken. Hierbij wordt voornamelijk gekeken naar de bacterie *P. aeruginosa* in een brandwondmodel. Er is voor deze bacterie gekozen omdat er al veel onderzoek verricht is specifiek naar quorum sensing van *P. aeruginosa*, en dit wordt in relatie gelegd met zijn veel veroorzakende infectie in een brandwond. De hoofdvraag luidt dan ook: **Heeft quorum sensing inhibitie een ontstekingsremmende werking op *P. aeruginosa* in een brandwondmodel?**

De volgende deelvragen zijn opgesteld om tot de beantwoording van deze hoofdvraag te komen:

1. *Wat is Quorum Sensing?*
2. *Wat zijn de verschillende QS moleculen van *P. aeruginosa* en hun functies?*
3. *Welke type cellen bevinden zich in een brandwond?*
4. *Wat is het effect van QS moleculen op de cellen binnen een brandwond?*
5. *Kan QS in *P. aeruginosa* worden geïnhibeerd?*

Elke deelvraag wordt in een apart hoofdstuk behandeld.

Het is van groot belang om antwoord op deze hoofdvraag te krijgen, aangezien er op deze manier een nieuwe en misschien wel betere therapie kan worden ontwikkeld voor heel veel verschillende soorten infecties. Er bestaan tegenwoordig natuurlijk ook al wel antibiotica om infecties van bacteriën te bestrijden. Echter wil het nog wel eens voorkomen dat bij gebruik van antibiotica niet alle bacteriën sterven. Door mutaties in het DNA van bacteriën kunnen sommige bacteriën het overleven, opnieuw uitgroeien en wederom een infectie veroorzaken. De bacterie is nu resistent geworden voor de voorheen gebruikte antibioticum. Door de snelle wereldwijde opkomende resistentie van bacteriën, biedt antibiotica niet altijd meer een oplossing. Hierdoor is het erg belangrijk dat er nieuwe methodes bedacht en ontwikkeld worden om bacteriën en hun infecties te bestrijden. Hier wordt dus onderzocht in hoeverre inhibitie van quorum sensing een uitkomst zou kunnen bieden.

## Hoofdstuk 1: Quorum Sensing

In de jaren 60 is ontdekt dat sommige bacteriën in staat zijn onderling te communiceren (Tomasz, 1965). Tegenwoordig is bekend dat de meeste, als niet alle, bacteriën in staat zijn tot deze vorm van communicatie (Miller & Bassler, 2001). Dit gebeurt door het produceren, uitscheiden en opvangen van bepaalde chemische moleculen. Ook wel quorum sensing (QS) genoemd.

Het gaat hierbij om een dichtheidsafhankelijke vorm van communicatie. Cellen produceren deze chemische signalen om ze vervolgens uit te scheiden in de extracellulaire omgeving. De nabij gelegen cellen en de producerende cel zelf, vangen vervolgens deze signalen weer op. De hoeveelheid ontvangen signaal wordt als het ware gemeten en zodoende kan er een concentratieafhankelijke reactie optreden. Meestal resulteert dit in veranderingen in de genexpressie. Wanneer bacteriën in overvloed aanwezig zijn, zijn functionele veranderingen vaak gewenst. En door middel van QS zijn bacteriën dus in staat om een verhoging van eigen populatiedichtheid te meten om vervolgens hun genregulatie hierop aan te passen. De hiermee verkregen metabolische en gedragsveranderingen kunnen er bijvoorbeeld voor zorgen dat er een biofilm ontstaat of dat de virulentie van de bacteriën sterker wordt (Thomson, 2011). De mogelijkheid tot communicatie, zowel binnen als tussen soorten, blijkt van essentieel belang te zijn voor zowel overleving van, als interactie tussen bacteriën.

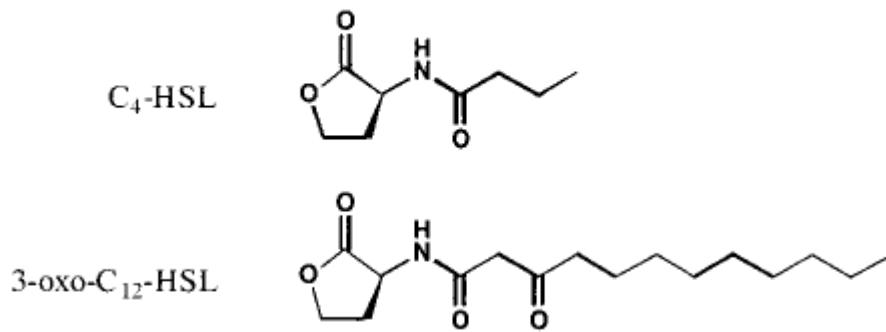
Het probleem is echter dat de QS moleculen niet alleen kunnen worden opgevangen door bacteriën, maar ook door andere nabij gelegen cellen. Welke cellen hier gevoelig voor zijn en wat het effect hiervan op deze cellen heeft, wordt in dit literatuuronderzoek onderzocht. Er wordt hierbij voornamelijk gekeken naar de bacterie *Pseudomonas aeruginosa* in een brandwondmodel.

## Hoofdstuk 2: De verschillende QS moleculen van *P. aeruginosa* en hun functies

QS komt zowel in Gram negatieve als Gram positieve bacteriën voor (Miller & Bassler, 2001). In dit onderzoek wordt gefocust op de bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Een aerobe Gram negatieve bacterie die onder andere bekend staat om het veroorzaken van infecties in brandwonden.

In de meeste Gram negatieve bacteriën wordt bij QS gebruik gemaakt van dezelfde regulator eiwitten. Het gaat hierbij om de eiwitten LuxI en LuxR. De LuxI eiwitten zijn verantwoordelijk voor de synthese van een autoinducer. Een specifiek geacyleerde homoserine lactone signaal molecuul (HSL). De LuxR eiwitten binden aan de HSL autoinducers wanneer zij boven een bepaalde concentratie komen. Dit gebonden LuxR-autoinducer complex veroorzaakt veranderingen in gen transcriptie. Hoe meer bacteriën aanwezig zijn, hoe meer LuxI wordt geproduceerd en hoe eerder de drempelwaarde is bereikt waarop het LuxR-autoinducer complex wordt gevormd. Dus door middel van het QS mechanisme LuxI en LuxR, kunnen Gram negatieve bacteriën veranderingen in populatie dichtheid koppelen aan gen expressie (Miller & Bassler, 2001).

In *P. aeruginosa* komen twee homologe LuxI/LuxR systemen voor (fig. 2). De LasI/LasR en de RhII/RhIR genaamd. LasI en RhII zijn beide autoinducers en zorgen voor de synthese van HSLs. LasI katalyseert *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) en RhII katalyseert *N*-(butyryl)-homoserine lactone (C4-HSL) (Miller & Bassler, 2001). Beide systemen werken samen waardoor er controle ontstaat over de expressie van meerdere virulente factoren. Alle verschillende HSLs bezitten een HSL ring. Het verschil tussen verschillende QS signaalmoleculen zit in de lengte van de koolstofketen van de acylgroep en de verschillende substituties aan deze keten (fig. 1). Door deze verschillen kunnen verschillende HSLs hele verschillende functies hebben.

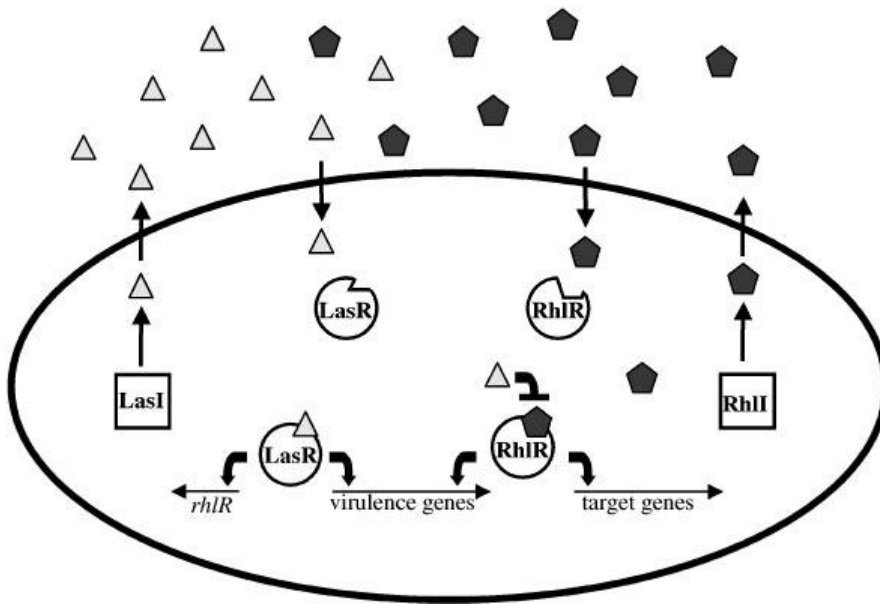


**Figuur 1.** (Tateda et al., 2003) **Structuurformules van de meest voorkomende QS moleculen in *P. aeruginosa*.**

Het bovenste figuur, C<sub>4</sub>-HSL ofwel *N*-(butryl)-homoserine lactone en het figuur eronder, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL ofwel *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone. Kenmerkend voor beide QS moleculen is de HSL ring. Het verschil tussen beide QS moleculen zit in de lengte van de acylgroep en de substituties aan deze keten. 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL heeft een acylgroep van 12 koolstofatomen en heeft op de derde koolstofatoom een dubbelgebonden zuurstofatoom. C<sub>4</sub>-HSL heeft een acylgroep van 4 koolstofatomen en geen substituties.

Bij een hoge concentratie bacteriën waarbij de drempelwaarde van LasI wordt bereikt, wordt het LasR-autoinducer complex gevormd. Dit complex bind vervolgens aan de genpromotor voorafgaand aan een aantal coderende genen die gedurende de initiatie van een infectie zorgen voor beschadigingen aan het gastheerweefsel. Het gaat hierbij om de volgende genen: het *lasB*, *lasA*, *toxA* en het *aprA* gen. *lasB* codeert voor een elastase, *lasA* voor een protease, *toxA* voor ExotoxinA en *aprA* voor een alkaline fosfatase (Miller & Bassler, 2001). Het LasR-autoinducer complex zorgt op zichzelf ook weer voor een positieve feedback loop door activatie van extra *lasI* expressie. Maar, dit niet alleen. Het LasR-autoinducer complex blijkt ook verantwoordelijk te zijn voor de activatie van het tweede QS systeem in *P. aeruginosa*. Het activeert de expressie van *rhIR*, waardoor *RhlI* wordt geproduceerd. Wanneer dit weer boven een bepaalde drempelwaarde komt, wordt het *RhlR*-autoinducer complex gevormd. Ook dit complex zorgt voor expressie van een aantal genen. Het gaat hierbij, net als het LasR-autoinducer complex om de genen *lasB* en *aprA*. Maar ook om de expressie van een tweede set specifieke target genen: de *rsoS*, *rhlAB*, *lecA* en *rhlI* genen (Miller & Bassler, 2001). Ook het *RhlR*-autoinducer zorgt voor een positieve feedback loop door activatie van extra *RhlI* expressie.

De LasR-autoinducer complex zorgt dus voor *rhIR* expressie waardoor het tweede QS systeem in werking gaat. Het blijkt echter dat 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (de autoinducer in het LasR-autoinducer complex), de binding tussen *RhlR* en C<sub>4</sub>-HSL (de autoinducer in het *RhlR*-autoinducer complex) voorkomt. Hierdoor wordt gezorgd dat de twee cascades in je juiste volgorde en pas na elkaar optreden.



**Figuur 2.** (Miller & Bassler, 2001) **De LasI/LasR en de RhII/RhIR QS systemen in *P. aeruginosa*.**

*P. aeruginosa* maakt gebruik van twee homologe LuxI/LuxR systemen, LasI/LasR en RhII/RhIR. LasI is verantwoordelijk voor de synthese van 3-oxo-C12-HSL (de driehoekjes) en RhII voor de synthese van C4-HSL (de pentagonen). LasR bindt aan 3-oxo-C12-HSL wanneer deze boven een bepaalde concentratie komen. Dit LasR-autoinducer complex bindt vervolgens aan promotors waardoor transcriptie optreedt van bepaalde virulente genen en het *rhIR* gen. Transcriptie van *rhIR* resulteert in initiatie van het tweede QS systeem. RhIR bindt aan C4-HSL wanneer deze boven een bepaalde concentratie komen. Dit RhIR-autoinducer complex bindt vervolgens aan een promotors die zowel een deel van dezelfde virulente genen als LasR-autoinducer complex reguleert, als andere target genen. 3-oxo-C12-HSL kan de formatie van het RhIR-autoinducer complex remmen, zodat het LasI/LasR systeem in stand is voordat de RhII/RhIR cascade begint.

### Hoofdstuk 3: Celtypes binnen een brandwond

Wanneer er onderzoek gedaan wordt naar verbetering van wondheling, is het erg belangrijk dat bekend is welke cellen er precies bij betrokken zijn, zodat onderzocht kan worden hoe de cellen precies aangetast worden en hoe cellen reageren op elkaars aanwezigheid. Aangezien in dit onderzoek gekeken wordt naar een brandwondmodel, zullen de cellen aanwezig in een brandwond onderzocht worden.

Wanneer de huid intact is, vormt deze epitheellaag de eerste barrière tussen microben in de externe omgeving en gastheerweefsel. Bij het ontstaan van een wond, is deze epitheellaag beschadigd en kunnen microben de gastheer binnendringen. Het aangeboren immuunsysteem komt direct op gang. De effector cellen die altijd circulerend in het bloed aanwezig zijn, migreren naar het beschadigde weefsel. Het gaat hierbij vooral om neutrofielen, mononucleaire fagocyten (monocyten/macrofagen) en lymfocyten.

Fagocyten (oa neutrofielen en macrofagen) zijn cellen met als belangrijkste functie het vernietigen van microben. Dit gebeurt in een aantal stappen. Eerst moeten deze cellen worden gerekruteerd naar de plaats van infectie. Vervolgens moeten de microben herkend worden en opgenomen worden door middel van fagocytose, waarna de microben worden vernietigd. Fagocyten zorgen ook voor de productie van bepaalde cytokines die een belangrijke rol spelen in verdere immuunrespons en weefselherstel, bijvoorbeeld celproliferatie en dilatatie van bloedvaten.

De immuuncellen die als eerste bij een infectie aankomen, zijn de neutrofielen. Macrofagen volgen vlak daarna, maar leven veel langer dan neutrofielen op de plaats van infectie. Macrofagen kunnen cel deling ondergaan op de plaats van infectie en zijn hierdoor in plaats van de neutrofielen, één à twee dagen na infectie de dominante effector cellen van het aangeboren immuunrespons. Macrofagen zijn ook belangrijk voor de stimulatie van angiogenese, waarbij vasculaire endotheelcellen nieuwe bloedvaten vormen. Dendritische cellen bevinden zich tussen epitheelcellen. Wanneer dendritische cellen een pathogeen ontdekken, gaan ze cytokines en chemokines produceren waardoor ze het pathogeen proberen te vernietigen. Naast deze belangrijke functie, zijn het ook antigeen presenterende cellen. Erg belangrijk voor initiatie van het adaptieve immuunsysteem. Ook fibroblasten hebben een belangrijke rol bij weefselherstel. Fibroblasten synthetiseren alle elementen van de extracellulaire matrix. Dit gebeurt door onder andere de productie van collageen en fibronectine. De wond kan zich mede dankzij fibroblasten volledig herstellen met littekenweefsel.

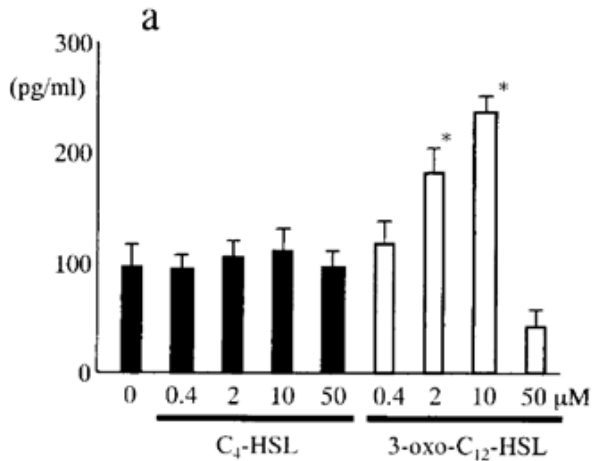
Er ontstaan echter vaak ontstekingen in een brandwond. Deze ontstekingen worden meestal veroorzaakt door de bacterie *P. aeruginosa*. Bij deze infectie zijn zowel het QS systeem LasI/LasR en het systeem RhlI/RhlR van belang. Beide systemen dragen bij aan de virulentie van *P. aeruginosa* (Rumbaugh, Griswold, Iglewski, & Hamood, 1999).

#### **Hoofdstuk 4: Het effect van QS moleculen op de verschillende cellen binnen een brandwond**

Zoals eerder behandeld, kunnen de *P. aeruginosa* bacteriën dankzij QS met elkaar communiceren zodat ze hun fenotype kunnen veranderen en zich als een eenheid kunnen gedragen. Dit kan tot een formatie van biofilms en activatie van virulente factoren leiden (Thomson, 2011). Het blijkt dat niet alleen de bacteriën zelf op de QS moleculen reageren, maar het blijkt dat QS moleculen ook effect hebben op eukaryote nabij gelegen cellen, zoals cellen van het immuunsysteem, waardoor het bestrijden van de bacteriële infectie door het immuunsysteem moeilijker wordt gemaakt. In dit hoofdstuk wordt naar het effect van QS moleculen, geproduceerd door *P. aeruginosa*, op de eukaryote cellen binnen een brandwond gekeken. Er wordt gefocust op de C4-HSL en 3-oxo-C12-HSL QS moleculen en vooral naar de volgende cellen gekeken: Epitheelcellen, vasculaire endotheelcellen, neutrofielen, macrofagen, lymfocyten, fibroblasten en dendritische cellen.

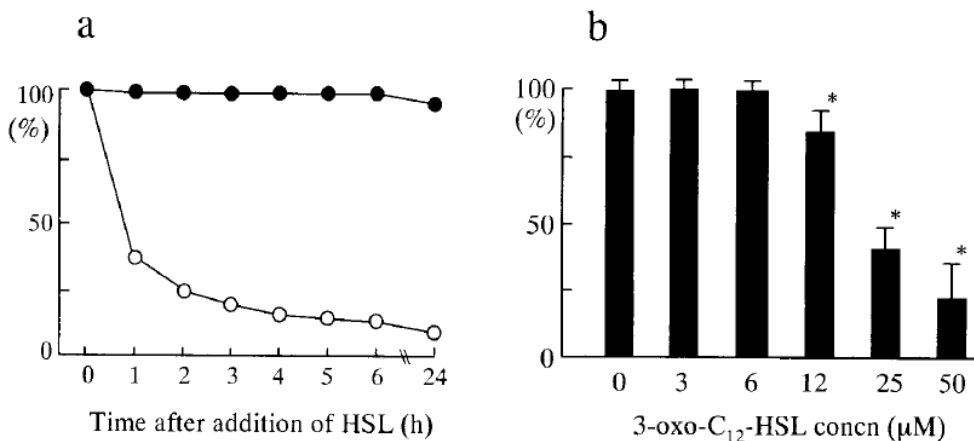
Het blijkt dat vooral het molecuul 3-oxo-C12-HSL een toxiciteit op bepaalde cellen heeft, waardoor deze cellen eerder in apoptose worden gebracht. De levensvatbaarheid van deze cellen worden dus zwaar aangetast. Ook zouden er veranderingen in de productie van chemokine interleukine 8 zijn waargenomen. IL-8 is verantwoordelijk voor de mobilisatie, activatie en de degranulatie van neutrofielen. Ook speelt het een grote rol in angiogenese.

Als eerste gaan we iets specifieker kijken naar het effect van C4-HSL en 3-oxo-C12-HSL op macrofagen. Uit een studie van Tateda et al uit 2003, blijkt dat 3-oxo-C12-HSL maar niet C4-HSL de productie van IL-8 in macrofagen stimuleert. Dit is onderzocht door de concentratie MIP-2 te meten van het supernatant van cultures met uit het beenmerg verkregen macrofagen. MIP-2 is een homoloog voor het humane IL-8. Bij een hoge concentratie 3-oxo-C12-HSL (50  $\mu$ M) treedt er echter een significante daling in deze productie op, wat erop duidt dat een bij relatief hogere concentraties 3-oxo-C12-HSL, de productie van IL-8 door macrofagen juist wordt geïnhibeerd (fig. 3).



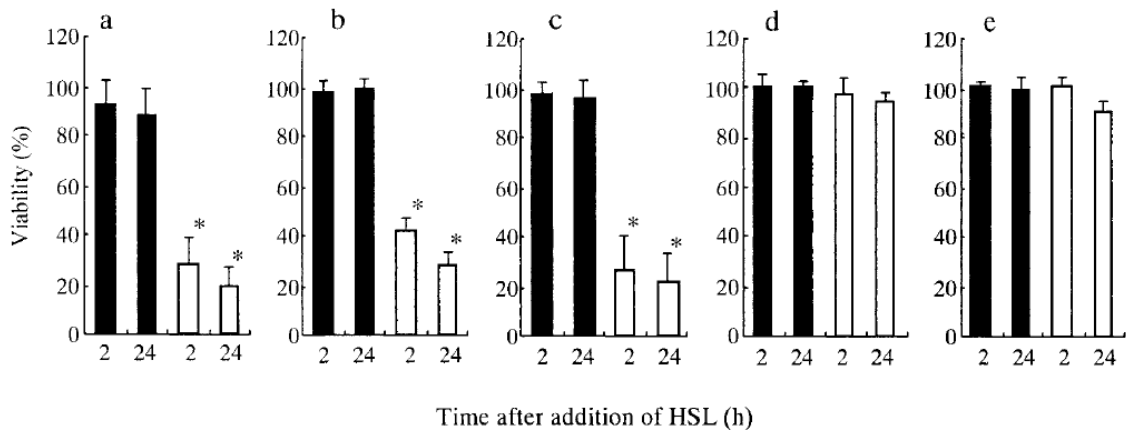
**Figuur 3.** (Tateda et al., 2003) **Het effect van C<sub>4</sub>-HSL en 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL op de productie van MIP-2 door macrofagen.** De macrofagen werden gedurende 18 uur geïncubeerd met verschillende concentraties C<sub>4</sub>-HSL (gesloten kolommen) of 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (open kolommen). MIP-2 concentraties in het supernatant werden bepaald door middel van ELISA ( $n = 5$ ). \*,  $P < 0.05$  vergeleken met een onbehandelde controle groep.

Vervolgens is de levensvatbaarheid van macrofagen onderzocht bij deze relatief hoge concentratie van zowel C<sub>4</sub>-HSL als 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. Ook hier blijkt dat C<sub>4</sub>-HSL geen effect heeft. 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL daarentegen stimuleert apoptose van macrofagen en heeft dus een significant negatief effect op de levensvatbaarheid van deze cellen (fig. 4).



**Figuur 4.** (Tateda et al., 2003) **Het effect van C<sub>4</sub>-HSL en 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL op de levensvatbaarheid van macrofagen.** In figuur a is te zien dat incubatie gedurende 1 tot 24 uur met 50 μM C<sub>4</sub>-HSL (gesloten cirkels) geen effect heeft op de levensvatbaarheid van macrofagen. Incubatie met 50 μM 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (open cirkels) gedurende 1 tot 24 uur heeft een significant negatief effect op de levensvatbaarheid van macrofagen, vergeleken met onbehandelde cellen ( $n = 5-7$ ). In figuur b werden macrofagen bij verschillende concentraties 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL gedurende 2 uur geïncubeerd. Ook hier werd de levensvatbaarheid onderzocht en vergeleken met een niet behandelde controle groep ( $n = 5-7$ ). \*,  $P < 0.05$ .

Ook is onderzocht of deze twee QS moleculen dan ook invloed op de levensvatbaarheid op andere cellen heeft zoals neutrofielen, endotheelcellen en monocytten. Wederom blijkt dat C<sub>4</sub>-HSL hierop geen effect heeft. Ook 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL blijkt geen apoptose te induceren in epitheelcellen. Echter is gebleken dat neutrofielen en monocytten hier wel gevoelig voor zijn. Neutrofielen blijken zelfs het meest gevoelig voor het cytotoxische effect van dit QS molecuul (fig 5). De cellen CCL-185 en Hep-2 zijn verkregen uit epitheelcellen en de cellen U-937 en P388D1 zijn monocytten.



**Figuur 5.** (Tateda et al., 2003) **Levensvatbaarheid van verschillende soorten cellen na incubatie met C4-HSL of 3-oxo-C12-HSL.** De cellen werden gedurende 24uur geïncubeerd met 50  $\mu$ M C4-HSL (gesloten kolommen) of 50  $\mu$ M 3-oxo-C12-HSL (open kolommen). Levensvatbaarheid van de cellen werd op verschillende tijdstippen onderzocht en vergeleken met een niet behandelde controle groep ( $n = 5$  to  $7$ ). In figuur werden neutrofielen onderzocht, b U-937 cellen, c P388D1 cellen, d CCL-185 cellen, e HEp-2 cellen. \*,  $P < 0.05$ .

3-oxoC12-HSL blijkt op nog meer humane immuuncellen invloed te hebben. Zo induceert het ook apoptose in dendritische cellen en CD4+ (T-helper 1) cellen (Boontham et al., 2008). Hetzelfde molecuul heeft ook invloed op de productie van IL-8 in fibroblasten. Naast IL-8 wordt de productie van cyclo-oxygenase 2 (zorgt voor de productie van prostaglandinen, die de verwijding en vernauwing van bloedvaten reguleert bij een ontsteking) en prostaglandine E<sub>2</sub> geïnduceerd (Smith, Kelly, Iglewski, & Phipps, 2002). 3-oxo-C12-HSL heeft ook een effect op de balans tussen de verschillende T-helper (Th) cellen in het immuunsysteem. De balans tussen Th1 en Th2 van de gastheer wordt dusdanig verstoord waardoor wederom een immunoreactie wordt verslechterd. De Th2 respons neemt de overhand. Bij een Th2 respons (die ook bekend staat voor het veroorzaken van allergieën) worden toxische stoffen uitgescheiden wat ook voor beschadiging van het gastheerweefsel kan leiden. Verandering in de Th1 Th2 balans gebeurt onder andere door de mogelijkheid van dit QS molecuul om het prolifereren van lymfocyten te kunnen inhiberen. Ook wordt IL-12 gedownreguleerd wat de activatie van een Th1 respons verlaagt. IgE productie wordt gestimuleerd, wat op zijn beurt ook weer een Th2 respons gestimuleerd (Telford et al., 1998). De Th2 cytokines IL-4, en IL-10 worden meer geproduceerd, waar de Th1 cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 juist minder worden geproduceerd (Boontham et al., 2008).

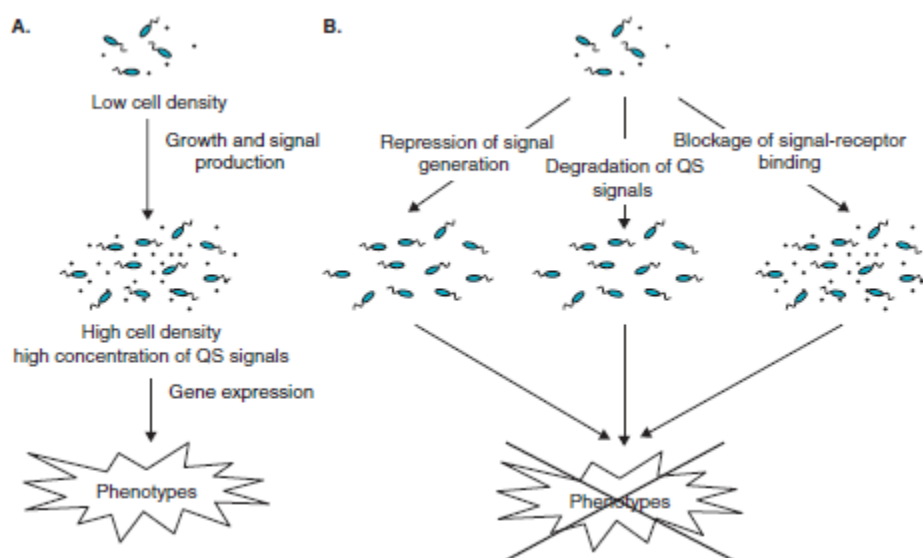
Kort samengevat kan gezegd worden dat het QS molecuul 3-oxo-C12-HSL bij een concentratie van 50  $\mu$ M apoptose in neutrofielen, macrofagen en monocytten induceert. Dit cytotoxische effect blijkt geen uitwerking op epitheelcellen te hebben. 3-oxo-C12-HSL is, in relatief hoge concentraties, ook verantwoordelijk voor inhibitie van IL-8 productie door macrofagen. IL-8 speelt een belangrijke rol bij angiogenese. Door verlaging van IL-8 productie heeft 3-oxo-C12-HSL dus ook een indirect effect op vasculaire endotheelcellen. Het Th1 en Th2 balans wordt beïnvloed waardoor de immunoreactie wordt veranderd. Verandering van de immunoreactie komt doordat 3-oxo-C12-HSL veel invloed heeft op de productie of inhibitie van bepaalde cytokines. QS moleculen zijn dus niet alleen verantwoordelijk voor inductie van bepaalde virulente factoren, maar ook voor het veranderen van de respons van de gastheer tegen de bacterie. Met name het signaal molecuul 3-oxo-C12-HSL is voor verschillende eukaryote cellen een immunomodulator en de productie van dit QS molecuul speelt een hele grote rol bij de pathogenese van *P. aeruginosa*, en het vermogen om het immuunsysteem te omzeilen.



## Hoofdstuk 5: QS inhibitie in *P. aeruginosa*

Uit het vorige hoofdstukken blijkt dat QS een grote invloed heeft op eukaryote cellen van de gastheer waardoor de immuunrespons wordt veranderd. Maar is het dan ook mogelijk om deze signaal moleculen te remmen zodat de cellen van de gastheer niet meer worden beïnvloed door de bacteriën en dus een normaal immuunrespons optreedt waardoor de bacterie beter te bestrijden is?

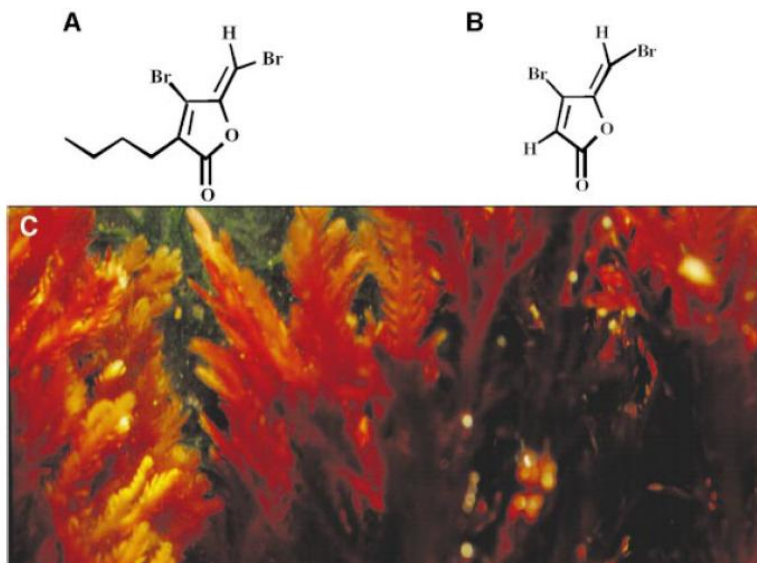
Om het QS systeem in bacteriën goed te laten werken, moeten bacteriën in staat zijn deze QS moleculen te synthetiseren, te detecteren en het aan of uit zetten van bepaalde target genen als respons op die detectie. Hier hebben we dus direct al drie aangrijpingspunten om QS te remmen (fig. 6). Breng één van deze punten uit balans en de communicatie tussen bacteriën ligt plat waardoor de bacteriën geen verandering in fenotype ondervinden en de overlevingskans en pathogenese sterk wordt aangetast (Pan & Ren, 2009).



**Figuur 6.** (Pan & Ren, 2009) **Aangrijpingspunten QS inhibitie.** In onderdeel A is de gewoonlijke manier van QS uitgebeeld. In onderdeel B staan drie mogelijkheden vermeld om QS te remmen. Door middel van het onderdrukken van de synthese van het signaal molecuul, het vernietigen van het signaal molecuul of een blokkade van de binding tussen signaal molecuul en zijn receptor.

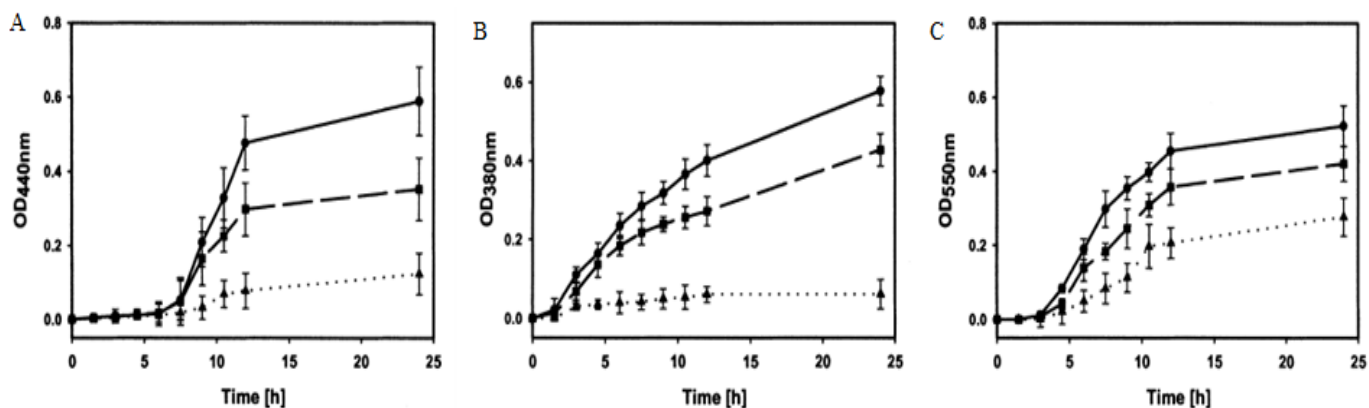
Er zijn een aantal agens bekend die QS kunnen inhiberen. Dit zijn zowel natuurlijke als gesynthetiseerde agens. Deze agens staan bekend als een alternatieve manier om microbiële infecties onder controle te houden, door het beïnvloeden of blokkeren van onderdelen in het QS systeem.

Een manier van QS inhibitie is het toevoegen van antagonisten voor de autoinducer receptor op het celmembraan van de bacterie. De zeewier *Delisea pulchra* staat bekend om de productie van biologisch actieve furanones. Deze gebromineerde furanones beschermen het zeewier tegen mariene bacteriën. Door middel van kleine veranderingen aan dit metaboliet, kan furanone C-30 gesynthetiseerd worden (fig. 7). Dit furanone blijkt een QS inhibitor (QSI) voor *P. aeruginosa* te zijn (Hentzer et al., 2003).



**Figuur 7.** (Hentzer et al., 2003) **Van een metaboliet in zeewier tot QSI.** In de afbeelding is het natuurlijk gevormde furanone (A) door *Delisea pulchra* (C) te zien. En het gesynthetiseerde furanone C-30, een QSI (B).

Het blijkt dat bij toevoeging van furanone C-30 aan cultures met *P. aeruginosa*, de virulentie van de bacterie wordt aangetast. De genen verantwoordelijk voor deze virulentie staan onder controle van het QS systeem (hoofdstuk 2). Zo wordt de activiteit van onder andere exoprotease, pyoverdine en chitinase significant verlaagd na toevoeging van furanone C-30 (fig. 8). Dit duidt er sterk op dat furanone C-30 een QSI is. Echter zijn er *in vivo* nog geen duidelijke resultaten voor gevonden.



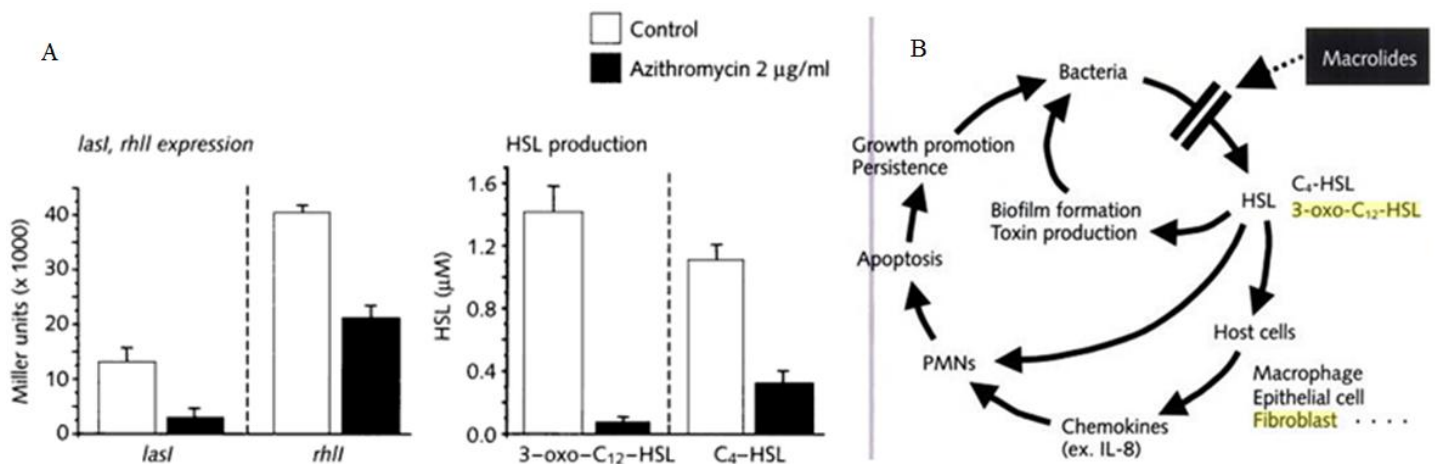
**Figuur 8.** (Hentzer et al., 2003) **De invloed van furanone c-30 op de virulentie van *P. aeruginosa*.** De cultures werden gekweekt zonder (cirkels), met 1mM (vierkantjes) en met 10mM (driehoekjes) furanone C-30. Bij onderdeel A werd de exoprotease activiteit gemeten, bij onderdeel B de pyoverdine activiteit en bij onderdeel C de chitinase activiteit.

Nog een mogelijkheid bij antagonisme zijn HSL analogen. Zo blijken *N*-(3-oxododecanoyl)-l-HSL en butyryl l-HSL te concurreren met 3-oxo-C12-HSL en C4-HSL voor de receptor binding en zorgen dus voor een blokkade in het QS systeem van *P. aeruginosa*. Er zijn nog meer analogen die ook als potentiële QSI werkzaam zouden kunnen zijn, zoals bijvoorbeeld butyrolactone en acetylbutyrolactone (Pan & Ren, 2009). In knoflook extract zitten ook stoffen die als QSI fungeren. Dit extract brengt veranderingen aan in het LuxR QS systeem, waardoor onder andere de expressie van het *LasB* gen, wordt verlaagd (Pan & Ren, 2009).

Naast antagonisme, kunnen er ook enzymen als QSI fungeren die de QS moleculen 3-oxo-C12-HSL en C4-HSL kunnen hydrolyseren. Zo zijn er in het geval van *P. aeruginosa* twee acylases QuiP en PvdQ

(Pan & Ren, 2009). Zij zijn in staat om de koolstof keten van de QS moleculen te breken waarna zij de koolstof keten zelf als energiebron gebruiken. De QS moleculen kunnen hun werking niet meer uitoefenen waardoor het QS systeem is geïnhibeerd. Door de hydrolysatie van de QS moleculen, worden de effecten die normaal gesproken veroorzaakt worden door de QS moleculen op nabijgelegen eukaryote cellen van de gastheer ook geremd, waardoor de immunreactie van de gastheer niet wordt beïnvloed.

Azithromycine is een macrolide antibioticum. Een antibioticum, die een grote rol speelt op het QS systeem in onder andere *P. aeruginosa*. Het zorgt bij 2 µg/ml voor inhibitie van de synthese van autoinducers, door het remmen van de transcriptie van *lasI* (met 80%) en *rhII* (met 50%), waardoor de productie van de QS moleculen 3-oxo-C12-HSL (met 6%) en C4-HSL (met 28%) lager ligt vergeleken met de controle groep zonder azithromycine (fig 9A) (Tateda et al., 2001).



**Figuur 9.** (Antibiotics as anti-inflammatory and immunomodulatory agents, Door Bruce K. Rubin, Jun Tamaoki) **Het effect van azithromycine op het QS systeem in *P. aeruginosa*.** In A is te zien dat azithromycine voor een verlaging in expressie van *LasI* en *rhII* zorgt. In B is te zien dat macrolides (zoals azithromycine) de synthese van C4-HSL en 3-oxo-C12-HSL inhibeert.

Er zijn dus ook macrolides inzetbaar als mogelijke QSIs voor infecties van *P. aeruginosa*. Door het remmen van de productie van de QS moleculen, kan er nog wel een biofilm worden gevormd, echter is deze biofilm dan minder invasief waardoor bepaalde virulente factoren geremd worden (Thomson, 2011). De invloed van de QS moleculen op de productie van bepaalde chemokines, inductie van apoptose in bepaalde cellen van het immuunsysteem en andere veranderingen in het immuunrespons van de gastheer worden ook geremd (hoofdstuk 4) (fig 9B).

QSI kunnen dus (zoals gezien in figuur 6) of zorgen voor een slechtere binding tussen receptor en QS molecuul door antagonisme (bijvoorbeeld furanones en HSL analogen), of QS moleculen hydrolyseren (bijvoorbeeld de acylases QuiP en PvdQ) of de synthese van de QS moleculen inhiberen (bijvoorbeeld de macromolide antibioticum azithromycine). Aangezien QS zo een belangrijke rol speelt voor bacteriën om te overleven en een sterke infectie te veroorzaken, is QS inhibitie ook een goede bestrijding mogelijkheid tegen bacteriën. De virulentie van bacteriën neemt door het wegnemen van QS sterk af. Het hydrolyseren ofwel remmen van de synthese van de QS moleculen bij infecties met *P. aeruginosa* zorgt ervoor dat de effecten van de QS moleculen op nabijgelegen cellen van de gastheer worden weggenomen. Hierdoor wordt het immuunrespons van de gastheer niet meer beïnvloed waardoor de immuunrespons sneller en sterker zal optreden waardoor de infectie beter te bestrijden is door de gastheer zelf.

## Conclusie en speculaties

Nu zullen we weer terug komen op de hoofdvraag van dit literatuuronderzoek: *Heeft QS inhibitie een ontstekingsremmende werking op P. aeruginosa in een brandwondmodel?*

Het is nu bekend dat QS inhibitie mogelijk is, waardoor de virulentie van bacteriën onderdrukt wordt en de effecten van de QS moleculen op nabij gelegen gastheercellen verminderd worden. Maar heeft deze QS inhibitie ook daadwerkelijk een ontstekingsremmende werking? Hier valt nog over te twisten. De onderzoeken die naar QS inhibitie verricht zijn, hebben voornamelijk resultaat geboekt bij *in vitro* experimenten. *In vivo* is ook wel wat resultaat gevonden, maar tussen verschillende wetenschappelijke artikelen zijn de resultaten weer anders, wat geen hoge betrouwbaarheid aan geeft. Ook blijkt het erg moeilijk te zijn om de concentraties QS moleculen in de intracellulaire matrix te meten. Hierdoor is erg moeilijk te bepalen of deze concentraties hoog genoeg zijn om voor dezelfde resultaten te zorgen als bij de *in vitro* experimenten.

Ik ben van mening dat er absoluut mogelijkheden voor QSIs als medicatie tegen *P. aeruginosa* infecties in brandwonden zijn. Vooral omdat blijkt dat voornamelijk de cellen van het immuunsysteem van de gastheer erg worden aangetast of gemanipuleerd, waardoor een normaal immuunrespons op een infectie niet meer mogelijk is. Er zal echter nog veel onderzoek verricht moeten worden naar zowel QSIs zelf als *P. aeruginosa* infecties binnen een brandwond, aangezien er erg weinig literatuur te vinden is over QS en het effect hiervan op specifiek de brandwond heling *in vivo*. Maar, QSI bieden absoluut een goed perspectief als medicatie bij infecties. Het biedt dus ook een goed perspectief voor infecties binnen een brandwond aangezien het immuunsysteem bij elke infectie ongeveer op dezelfde manier optreedt.

Vooraf macrolides en enzymen die QS moleculen (en dan met name 3-oxo-C12-HSL) kunnen afbreken bieden het grootste perspectief als medicatie tegen een *P. aeruginosa* infectie binnen een brandwond wanneer vooral het doel is om de negatieve effecten van QS moleculen op de eukaryote gastheercellen weg te nemen. Aangezien deze stoffen ervoor zorgen dat er minder QS moleculen aanwezig zijn in de extracellulaire matrix.

## Literatuurlijst

Boontham, P., Robins, A., Chandran, P., Pritchard, D., Camara, M., Williams, P., et al. (2008).

Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 115(11), 343-351.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., et al. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22(15), 3803-3815.

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199.
- Pan, J., & Ren, D. (2009). Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(11), 1581-1601.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., & Hamood, A. N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and Immunity*, 67(11), 5854-5862.
- Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H., & Phipps, R. P. (2002). The *Pseudomonas* autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(5), 2636-2642.
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J. C., Kohler, T., Yamaguchi, K., & Van Delden, C. (2001). Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1930-1933.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., et al. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infection and Immunity*, 71(10), 5785-5793.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., et al. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infection and Immunity*, 66(1), 36-42.
- Thomson, C. H. (2011). Biofilms: do they affect wound healing? *International Wound Journal*, 8(1), 63-67.

Tomasz, A. (1965). Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product:  
an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature*, 208(5006), 155-159.