

## **Nederlandse samenvatting**

## Ontwikkeling van nieuwe bacteriële anti-hechting coatings voor hydroxyapatiet

Orale biofilms, zoals tandplaque, zijn betrokken bij aandoeningen zoals cariës, gingivitis en parodontitis. De vorming van een orale biofilm begint met de aanhechting van bacteriën aan de tandpellicle (laagje speekseiwitten) op de tanden. Deze aanhechtingsfase wordt gevolgd door de productie en groei van een polymere extracellulaire matrix, rijping van de biofilm en daaropvolgend verspreiding van de cellen. Voor het verwijderen van een biofilm zijn verschillende behandelingen voorhanden zoals tandenpoetsen of het spoelen met antimicrobiële middelen. In de praktijk blijkt het echter lastig een biofilm geheel te verwijderen. Bacteriën hechten bij voorkeur aan oppervlakken die hydrofoob (waterafstotend) zijn, een zekere mate van ruwheid bezitten of bedekt zijn met een stof die de aanhechting bevordert, zoals de tandpellicle. Om de aanhechting van bacteriën aan oppervlakken te voorkomen wordt onderzoek verricht aan de ontwikkeling van bacterie-afstotende verbindingen die kunnen worden toegepast als bacterie-afstotende coating (films, lagen) op een oppervlak. Het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, was gericht op de ontwikkeling van nieuwe coatings met bacterie-afstotende werking die aangebracht kunnen worden op hydroxyapatiet ( $\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), het belangrijkste mineraal in tandglazuur.

### *Het hydroxyapatiet-bindend domein in speeksel agglutinine*

In eerste instantie werd onderzoek verricht naar het identificeren van stoffen die kunnen hechten aan HA om te dienen als 'anker' voor een groter, bacterie-afstotend HA-bindend *conjugaat*. Hiervoor werd gekeken naar natuurlijk voorkomende stoffen zoals het speekseiwit agglutinine (SAG) en niet-natuurlijk voorkomende stoffen die werden geïdentificeerd met de techniek faag display.

Uitgaande van SAG, dat van nature voorkomt in de tandpellicle, is een peptide geïdentificeerd dat aan HA bindt: P3 (**hoofdstuk 2**). SAG is een hoogmoleculair glycoproteïne dat door speekselklieren wordt uitgescheiden en in de tandpellicle voorkomt. In speeksel bevordert SAG de aggregatie (klontering) van bacteriën, wat de verwijdering van bacteriën vergemakkelijkt. In de pellicle daarentegen, bevordert SAG de aanhechting van bacteriën als *Streptococcus mutans* welke betrokken is bij het ontstaan van cariës.

SAG is opgebouwd uit 13 zeer homologe (sterk gelijkende) scavenger receptor cysteine-rijke (SRCR) domeinen. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat het deel van SAG dat betrokken is bij de binding van bacteriën bestaat uit een eiwitlus van 16 aminozuren (QGRVEVLYRGSWGTVTC).

Dit motief, P2 genoemd, is in 10 van de 13 SRCR domeinen aanwezig. Uit ons onderzoek bleek dat een ander deel van de SRCR domeinen, door ons aangeduid als P3, bestaande uit 18 aminozuren (DDSWDTNDANVVCRLGA) aan HA te binden. P3 bezit vier negatief geladen asparaginezuur residuen (D). Het is mogelijk dat via deze asparaginezuur residuen P3 aan de calciumionen van het HA bindt. Opmerkelijk is dat uit *in silico* kristallografische analyse van het SRCR domein blijkt dat de oriëntatie van P2, het bacteriebindende domein van SAG, tegenovergesteld is aan die van P3. Dit zou de dubbele rol van SAG bij de homeostase van bacteriën kunnen verklaren. Bij de binding aan HA vormt P3 vermoedelijk het deel waarmee een SAG aan het oppervlak wordt verankerd. Het P2, dat zich aan de tegenovergestelde zijde bevindt, zou hierdoor in contact komen met het micromilieu waar het de binding van bacteriën kan faciliteren.

#### *Functionalisering van P3 met polyethyleenglycol*

Polyethyleenglycol (PEG) is een hydrofiel polymeer met bacterie-afstotende eigenschappen. Voor de ontwikkeling van een HA-bindende bacterie-afstotende verbinding werd P3 gekoppeld aan PEG tot een P3-PEG conjugaat. Dit gebeurde op twee manieren: 1) chemisch en 2) enzymatisch.

Een P3-PEG conjugaat werd chemisch gesynthetiseerd door PEG covalent aan P3 te koppelen tijdens de synthese. De bacterie-afstotende werking van het P3-PEG conjugaat werd onderzocht voor twee bacteriën: *S. mutans* en *Staphylococcus epidermidis*. Laatstgenoemde bacterie maakt deel uit van de normale microflora van de huid, maar kan zich ook hechten aan medische hulpmiddelen zoals catheters, shunts, pacemakers of kunstgewrichten, waardoor infecties kunnen ontstaan. Uit ons onderzoek bleek dat P3 enige bacterie-afstotende eigenschappen bezit. Deze zijn mogelijk het gevolg van de negatieve lading van het P3 peptide waardoor de negatief geladen bacteriële membraan en celwand worden afgestoten. Conform de verwachting leidde conjugatie van P3 met PEG tot een verdere versterking van de intrinsieke bacterie-afstotende werking van P3 (**Hoofdstuk 2**).

In **hoofdstuk 3** werd PEG met het enzym Sortase A (SrtA) gekoppeld aan P3 dat al aan een oppervlak gehecht was. SrtA is een transpeptidase dat *in vivo* sequentiespecifiek eiwitten verankert aan de celwand van Gram-positieve bacteriën. Het SrtA herkent een specifiek aminozuurmotief (LPXTG) in eiwitten die in de celwand worden ingebouwd. SrtA koppelt deze eiwitten vervolgens aan GGGG-ketens (pentaglycine ketens) in de celwand. In het onderzoek beschreven in hoofdstuk 3 is met behulp van SrtA PEG-LPETG gekoppeld aan een (Gly)<sub>5</sub>P3

peptide coating op een oppervlak. Het aldus enzymatisch gecreëerde P3-PEG conjugaat werd onderzocht op bacterie-afstotende eigenschappen tegen de bacterie *Yersinia pseudotuberculosis*. Vergelijkbaar met de resultaten uit hoofdstuk 2 werd gevonden dat P3 enige bacterie-afstotende eigenschappen bezat tegen *Y. pseudotuberculosis*. Eveneens vertoont het P3-PEG conjugaat een sterkere bacterie-afstotende werking dan P3 (**Hoofdstuk 3**). Deze methode voor het creëren van bacterie-afstotende oppervlakten lijkt dus een veelbelovende strategie voor toepassing bij biomedische materialen waarbij directe covalente binding aan bacterie-afstotende verbindingen zoals PEG niet mogelijk is.

#### *Faag display en binding van peptiden aan de speekselcellicle*

Faag display is een methode voor het identificeren van peptiden die selectief binden aan allerlei soorten moleculen, bijvoorbeeld enzymen, eiwitten, en (synthetische) biomaterialen. In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 4**, zijn gebruikmakend van deze techniek zijn 10 verschillende speekselcellicle-bindende peptiden (SPBPs) verkregen. De peptiden werden onderzocht voor binding aan onbehandeld HA en speeksel-gecoat HA. Van de 10 SPBPs vertoonde SPBP 10 de beste binding aan speeksel-gecoat HA. SPBP 10 bevat 5 hydrofobe aminozuren (NSAAVRAYSPPS), die mogelijk tezamen betrokken zijn bij de interactie met de speekselcellicle. Bovendien toonde *in silico* analyse van de secundaire structuur van dit peptide een tendens tot de vorming van een alfa-helix structuur (die de residuen AAVR omvat). Ook deze karakteristieke conformatie structuur zou een belangrijke rol kunnen spelen bij de binding aan de speekselcellicle. Verder is de affiniteit van SPBP 10 voor HA wellicht het gevolg van de aanwezigheid van het positief geladen aminozuur arginine (R) dat kan binden aan de negatief geladen fosfaationen in HA.

Experimenten wezen uit dat de binding van SPBP 10 aan HA en speeksel-gecoat HA niet beïnvloed wordt door calciumionen, welke in speeksel voorkomen. Deze resultaten suggereren dus dat de binding van SPBP 10 niet wordt gemedieerd door de calciumionen op het oppervlak van HA. Dit is in overeenstemming met het feit dat SPBP 10 geen negatief geladen residuen bevat die mogelijk zouden kunnen binden aan positief geladen calciumionen. Na toevoeging van het detergent Tween-20 bleef de affiniteit van SPBP 10 voor de speekselcellicle gehandhaafd, hetgeen erop duidt dat de binding hoogstwaarschijnlijk niet het gevolg is van hydrofobe interacties. Verder bleek het dat SPBP 10 bacterie-afstotende eigenschappen heeft voor *Streptococcus gordonii*, een vroege kolonisator. Dit onderzoek duidt erop dat faag display

gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van middelen die toegepast kunnen worden om de vroege stadia van binding van bacteriën op biomaterialen tegen te gaan.

*Bacterie-afstotende en bactericide werking van sfingosinen*

Sfingosinen zijn natuurlijk voorkomende verbindingen die bestaan uit een positief geladen aminoalcoholgroep en een verzadigde of onverzadigde hydrofobe koolwaterstofketen. In ander onderzoek is aangetoond dat sfingosinen in oplossing een bacteriedodende werking hebben tegen zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën. In **hoofdstuk 5** en **6** wordt beschreven dat het aanbrengen van een coating met sfingosinen een effectieve methode is om de aanhechting van bacteriën op HA te voorkomen. Deze remming van aanhechting wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door een wijziging van de fysisch-chemische eigenschappen van het oppervlak, zoals een verandering in lading en hydrofobiciteit, welke een belangrijke rol spelen bij de aanhechting van bacteriën aan oppervlakten. Experimenten wezen uit dat een coating van HA met sfingosines de aanhechting van bacteriën zoals *S. gordonii* en *Streptococcus sanguinis* beïnvloedt. Er werden opmerkelijke verschillen waargenomen tussen structureel verwante sfingosines zoals sfinganine, fytosfingosine (PHS) en fytosfingosine-1-fosfaat (PHS-1-PO<sub>4</sub>). Bijvoorbeeld, de aanhechting van *S. gordonii* en *S. sanguinis* aan HA werd door sfinganine respectievelijk 80- en 100-voudig geremd terwijl PHS geen bacterie afstotende eigenschappen bezat (**Hoofdstuk 5**). Sfinganine remt de aanhechting van *S. mutans* aan HA 1000-voudig (**Hoofdstuk 6**). Kwantitatieve analyse van gebonden sfingosine toonde aan dat, ondanks het feit dat sfinganine 50 procent minder aan HA bond dan PHS, het aanhechting van *S. gordonii* en *S. sanguinis* maximaal remde. Binding van *S. gordonii* aan HA werd geremd door coatings van sfinganine, PHS-1-PO<sub>4</sub> en stearoyl PHS, terwijl die van *S. sanguinis* voornamelijk werd geremd door een sfingosine coating op HA. Deze verschillen zouden het gevolg kunnen zijn van de hogere mate van hydrofobiciteit van *S. sanguinis* in vergelijking met *S. gordonii*. Verondersteld mag worden dat de hydrofobe *S. sanguinis* meer afgestoten zal worden door de geladen eindgroepen van sfingosines dan de meer hydrofiele *S. gordonii*. Aan de andere kant remt PHS-1-PO<sub>4</sub>, dat nog sterker hydrofiel is, *S. gordonii* in dezelfde mate als sfinganine. Dat is wellicht het gevolg de elektrostatische repulsie tussen de negatief geladen fosfaatgroep van sfingosine en het negatief geladen bacterieoppervlak.

Op theoretische gronden kan aangenomen worden dat sfingosinen na binding aan het HA oppervlak aggregaten zullen vormen (in de vorm van een lipidedubbellaag of micel-achtige structuren), waarbij de positief geladen eindstandige groepen zowel naar de vloeistoffase zijn

gericht, als geadsorbeerd zijn aan het HA oppervlak. Sfinganines bezitten een verzadigde acylketen waardoor zij vermoedelijk een meer rigide laag zullen vormen dan onverzadigde analogen, en daarom minder kwetsbaar zijn voor verstoring dan meer vloeibare coatings bestaande uit sfingosine of PHS.

In **hoofdstuk 7** werd de bactericide werking van structureel verwante sfingosinen op *S. mutans* vergeleken onder verschillende omstandigheden: 1) bacteriën in de planktonische fase, 2) in intacte biofilms en 3) uit verstoorde biofilms. Hieruit bleek dat PHS, sfingosine en sfinganine aanzienlijk verschillen in de mate waarin de aanhechting wordt beïnvloed. Sfingosine had een veel hogere bactericide (bacterie-dodende) werking tegen bacteriën in biofilms (100-voudige afname) dan PHS en sfingosine (respectievelijk 5- en 10-voudige verlaging). Dit kan gerelateerd zijn aan het vermogen van sfingosinen om de hydrofiele extracellulaire laag polysacchariden van de biofilm te penetreren, maar ook aan een hogere beschikbaarheid van vrij sfingosine vergeleken met PHS en sfinganine. PHS en sfingosine bezaten een maximale bactericide werking tegen bacteriën in planktonische fase en bacteriën uit verstoorde biofilms, terwijl sfinganine minder effectief was tegen bacteriën in de planktonische fase en uit verstoorde biofilms. Dit ondersteunt de observatie dat remming van de binding van *S. mutans* aan HA schijfjes met een sphinganine-coating vermoedelijk niet het gevolg is van de bactericide werking.

Het feit dat sfingosinen zowel de adherentie van bacteriën remmen als een bactericide werking bezitten suggereert dat zij mogelijk gebruikt kunnen worden als anti-biofilmmiddel om orale biofilms te voorkomen en te elimineren.

#### *Peptiden versus sfingosines*

In dit proefschrift is de mogelijke toepassing van peptiden en sfingosines als coating van HA tegen biofilms onderzocht. Mogelijke voor- en nadelen van deze twee soorten moleculen zijn samengevat in onderstaande tabel 1.

Tabel 1. Voor- en nadelen van de toepassing van peptiden en sfingosines als coatingmateriaal tegen biofilms.

|             | Voordelen   | Nadelen  |
|-------------|---|--|
| Peptiden    | <p>-Peptiden kunnen chemisch gesynthetiseerd worden.</p> <p>-Verbeteringen en aanpassingen van peptiden zijn mogelijk door organische synthese. Door het vervangen van specifieke aminozuren kan zeer nauwkeurige optimalisatie plaatsvinden.</p> | <p>-Peptiden zijn gevoelig voor proteolytische afbraak.</p> <p>-De productie van peptiden is kostbaarder dan die van sfingosines.</p> <p>-De werking van peptiden is relatief specifiek wat de applicatiemogelijkheden mogelijk beperkt. Zo heeft P3 peptide een adherentie-remmende werking maar geen bactericide werking.</p> <p>-Peptiden kunnen mogelijk aanleiding geven tot een toxische of allergische reactie.</p> |
| Sfingosines | <p>-Sfingosines hebben een veelzijdige werking met ruime toepassingsmogelijkheden. Zo bezitten zij naast adherentie-remmende activiteit ook een bactericide werking.</p> <p>-In het algemeen worden sfingosines als veilig beschouwd.</p>         | <p>-Chemische modificatie van sfingosines is relatief moeilijk.</p>  |

#### *Mogelijkheden voor toekomstig onderzoek*

Met behulp van verschillende onderzoeksmethoden zijn in het onderzoek dat beschreven is in deze dissertatie een aantal verbindingen ontdekt en ontwikkeld die de aanhechting van bacteriën aan oppervlakken zoals hydroxyapatiet kunnen remmen. Deze verbindingen: peptiden, PEG-geconjugeerde peptiden en sfingosines, bezitten alle een bepaalde mate van een anti-biofilmactiviteit waardoor zij wellicht in de praktijk toegepast kunnen worden om biofilms te bestrijden op HA oppervlakken zoals tandglazuur en tandheelkundige implantaten.

De experimenten die in dit proefschrift worden beschreven zijn *in vitro* uitgevoerd waarbij gebruik werd gemaakt van bacteriën in monocultuur. Verder onderzoek is nodig om te bestuderen of de verbindingen soortgelijke effecten hebben op de groei en samenstelling van

gemengde biofilms; biofilms die bestaan uit meer dan één bacteriesoort. Indien de verbindingen *in vitro* soortgelijke effecten hebben op gemengde biofilms, kunnen in klinisch onderzoek de effecten in proefdieren en mensen worden bestudeerd. Indien de verbindingen ook *in vivo* klinische effectief blijken, kunnen zij toepassing vinden in mondverzorgingsproducten als mondspoelmiddelen, tandpasta's en mondsprays.