

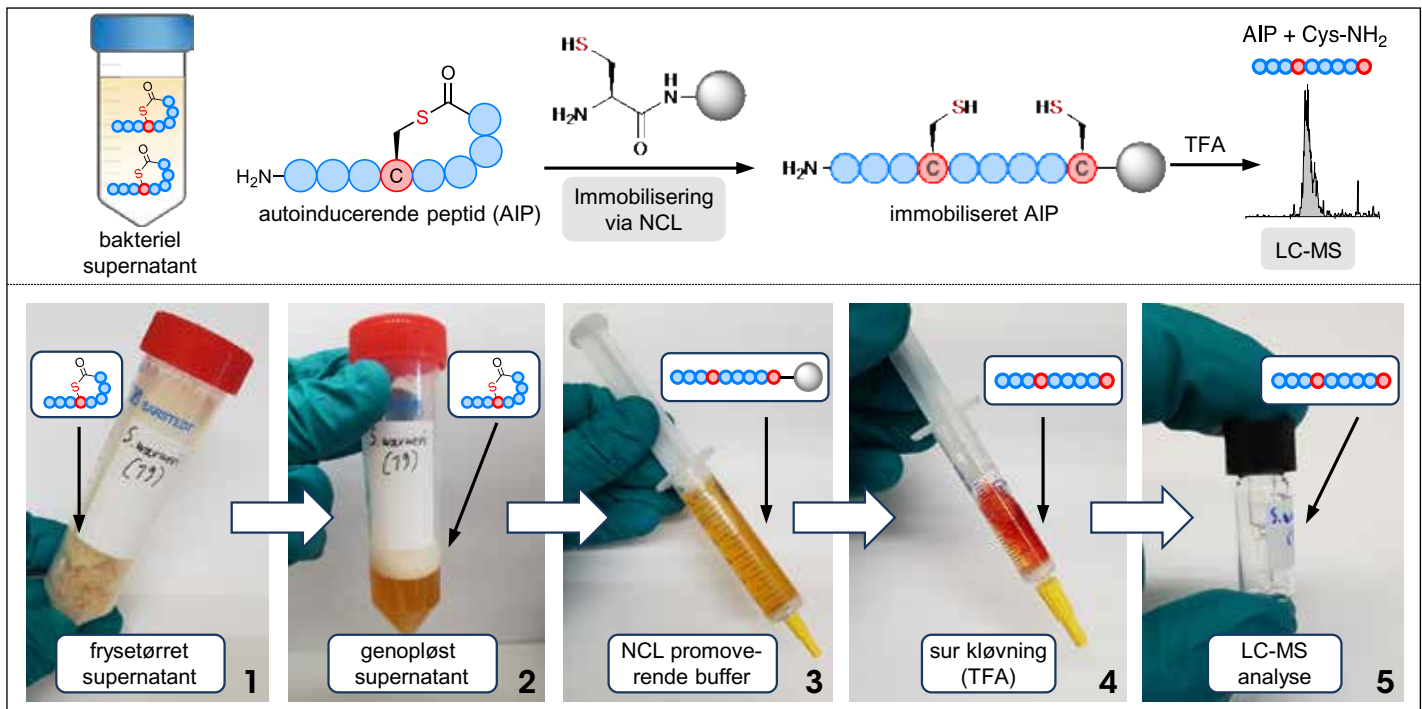


Foto: Michael Barrett Boesen.

Christian A. Olsen (th.) og Bengt H. Gless.

Ny metode identificerer stafylokokkers signalmolekyler

Professor Christian A. Olsen og hans forskningsgruppe har udviklet en simpel metode til hurtigt at identificere stafylokokkers signalmolekyler. Jo flere signalmolekyler, der identificeres, jo bedre vil man kunne forstå, hvordan og hvornår stafylokokker giver anledning til infektioner. Metoden kan også anvendes til andre Gram-positive bakterier.



Figur 1.

Af Katrine Meyn, km@techmedia.dk

I snart 20 år har man vidst, at stafylokokker kommunikerer med hinanden ved hjælp af kemiske signalstoffer kaldet Auto-Inducerende Peptider (AIP'er). AIP'erne findes kun i meget små koncentrationer omkring stafylokokbakterierne, og de har alle forskellig sammensætning. Derfor har det indtil nu været svært for forskerne at undersøge dem nærmere.

Men nu har ph.d.-studerende Bengt H. Gless fra professor Christian A. Olsens forskningsgruppe udviklet en metode, der effektivt og hurtigt kan identificere AIP'er ud fra komplekse blandinger. På den måde kan meget små mængder af AIP'er koncentreres, så de kan detekteres med standardudstyr.

Indtil metoden blev taget i brug, var der identificeret 11 AIP'er fra seks forskellige stafylokok-bakteriestammer. Med den nye metode er dette antal fordoblet.

AIP'er består af 7-12 aminosyrer og indeholder en C-terminal cyklick thiolakton (eller lakton). Metoden virker indtil videre kun på thiolaktoner, men har alligevel en bred anvendelighed, idet diversiteten af Gram-positive bakterier, der danner sådanne signalmolekyler, er stor.

Og perspektiverne er spændende. Når man har afdækket, hvilke signalstoffer stafylokok-bakterier bruger til quorum sensing, og hvordan de påvirker andre stammer, vil man kunne anvende denne viden til udvikling af nye hæmmere, og dermed modvirke etablering af en infektion (se faktaboks på side 14).

Sådan virker metoden

Ideen bag metoden bygger på følgende viden:

- C-terminale thiolaktoner er reaktive intermediære i NCL-reaktioner (native chemical ligation-reaktioner), og
- AIP'er reagerer med tioler og danner lineære C-terminale thioestere.

Denne viden førte til hypotesen, at en syrestabil Rink-amid-resin funktionaliseret med ubeskyttet cystein, ville fange AIP-molekyler kovalent fra den bakterielle supernatant via en NCL-reaktion. Derfor bygger metoden på brugen af en NCL-reaktion til selektivt at ekstrahere thiolaktoner fra supernatanten af medium anvendt til bakterielle kulturer efter centrifugering.

Metoden kan opdeles i følgende trin, figur 1:

Trin 1: Frysetørret supernatant af den centrifugerede bakteriekultur indeholder det makrocycliske peptid.

Trin 2: Supernatanten tilsættes cystein-funktionaliseret Rink-amid-resin.

Trin 3: Native chemical ligation (NCL) er en kemoselektiv reaktion, der normalt anvendes til at koble ubeskyttede peptidfragmenter i kemisk syntese af proteiner. Det involverer en reversibel trans-thioesterifikation, der terminerer, når der sker et S- til N-acylskift til aminogruppen i cystein, hvilket giver en amidbinding. Dvs. cystein, bundet til resinen, reagerer med AIP thiolaktonen, hvorved den makrocycliske ring åbnes.

Trin 4: Når AIP'en er fanget på resinen, kan den vaskes for at fjerne kontaminanter. Peptidet spaltes fra resinen under sure betingelser (ved tilsætning af trifluor-eddikesyre (TFA)), hvilket giver et lineært peptid med en C-terminal amideret cystein tilføjet.

Trin 5: Dette peptid kan analyseres ved hjælp af standard LC-MS og identificeres ved at korrelere med masser beregnet ved hjælp af den genetiske sekvens af propeptidet AgrD. Ved at kombinere viden opnået med LC-MS med viden fra dette gen, der koder den matchende peptidsekvens, opnås en hurtig identifikation af det udskilte signalpeptid.

KEN HYGIENE SYSTEMS
Clean, Lean & Green

- Innovative totaløsninger
- Desinficerende vasketeknologi
- Autoklaver
- Robot logistik
- Landsdækkende serviceforretning

Tilpasset netop dine behov
Kontakt os på 6263 1091 - Ken@ken.dk - www.ken.dk

■ NY METODE

Identifikation af 11 nye signalmolekyler

Det er indtil nu lykkedes at identificere 16 signalpeptider, heraf var de fem kendte i forvejen, og de 11 var ukendte *Staphylococcus*-peptider. De identificerede peptider blev syntetiseret og derefter testet for deres potentielle evner til at påvirke quorum sensing. Det fremgik, at to af signalmolekylerne var ekstra interessante, idet de begge virker som agonister for quorum sensing i fremmede bakteriestammer.

Styrker og begrænsninger

Metoden er enkel og giver hurtige resultater. Alt, hvad der kræves, er muligheden for at dyrke bakterier, nogle relativt billige reagenser, LC-MS-udstyr og genomsekvens data for propeptidet.

Metodens kemoselektivitet reducerer risikoen for uønskede sidereaktioner. Metodens sensitivitet er høj, der kan detekteres peptid-koncentrationer i supernatanterne ned til 12,5 nM, hvilket er passende, idet koncentrationerne af de makrocycliske peptider typisk ligger i den lave ende af μM -området i bakterielle supernatanter.

■ Quorum sensing

I slutningen af 1960'erne opdagede man, at bakterier kommunikerer med hinanden ved at udsende små signalmolekyler (API'er).

Hvis der er meget få bakterier, vil der være meget få signalmolekyler, der forsvinder via diffusion.

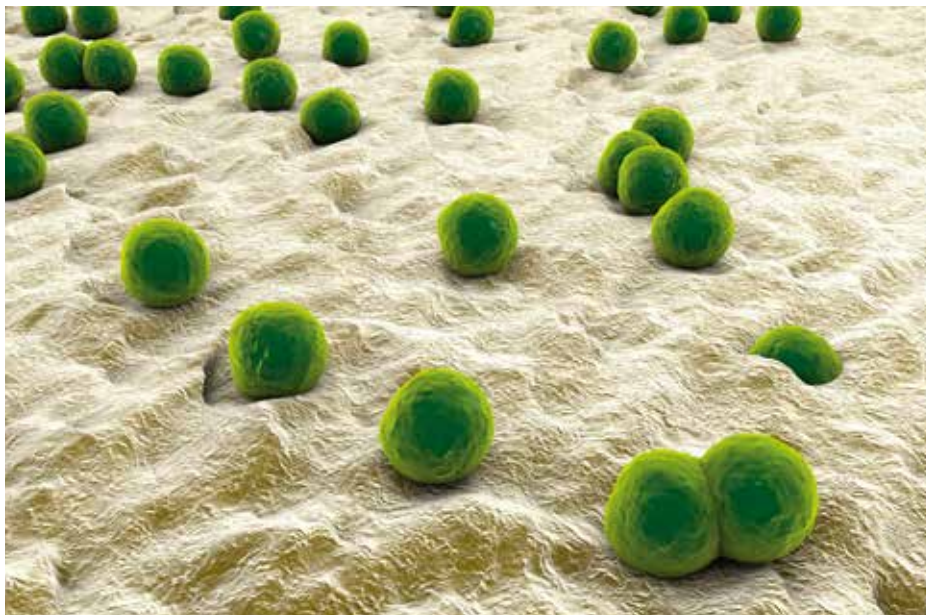
Hvis der er tilpas mange bakterier samme sted, vil der tilsvarende være flere signalmolekyler, og bakterierne "mærker", at der er sket en ændring af signalkoncentrationen i deres omgivelser. Når der nås et bestemt niveau, igangsættes quorum sensing, og bakterierne koordinerer deres opførsel.

Det er meget vigtigt for patogene bakterier at kunne koordinere virulensen for at undvige værts immunrespons og kunne etablere en succesfuld infektion.

Dvs. bakterierne befinder sig i en slags dvale, der varer, lige indtil de i fællesskab beslutter, at det er tid til at udbryde i sygdom.

Ud over produktion af virulensfaktorer kan quorum sensing igangsætte luminescens og biofilmdannelse m.m.

Mekanismen har fået navnet "quorum sensing" efter det romerske senat, hvor en beslutningsdygtig forsamling blev kaldt et quorum.



Stigningen i antibiotika-resistens betyder, at der er et stigende behov for nytænkende løsninger. At ramme virulensen i en bakteriel infektion i stedet for patogenets levedygtighed er et sådant bud på en alternativ metode.



■ Stafylokokkers kommunikation er nøglen

Stafylokokbakterier er den mest udbredte årsag til infektioner i huden. Særligt de antibiotikaresistente stafylokokker (MRSA – methicillin resistent *Staphylococcus aureus*) er problematiske, da selv mindre infektioner kan have alvorlige helbredsmæssige konsekvenser, som for eksempel blodforgiftning.

Både harmløse og antibiotikaresistente stafylokokkers evne til at fremkalde sygdom hos mennesker styres af signalmolekyler, som de selv producerer. Signalmolekylerne afgør, afhængigt af antal, hvordan stafylokokker kommunikerer med hinanden, og hvornår de skifter fra at være i en harmløs koloniserings-tilstand til en tilstand, hvor de er farlige og producerer toksiner, som resulterer i infektion.

En mulig begrænsning i metoden er den potentielle tilstedeværelse af konkurrerende sidereaktioner, som muligvis kan medføre tvetydige resultater, hvis de ikke forudses.

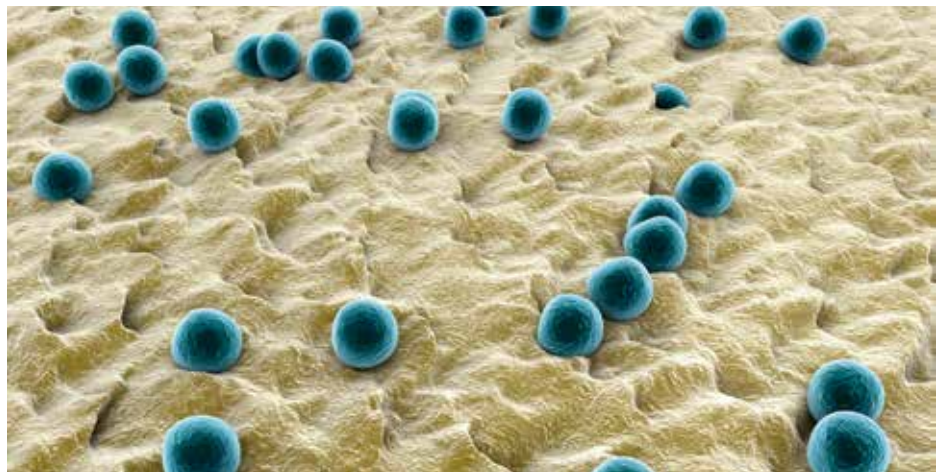
Fremtidige muligheder

Ifølge Christian A. Olsen er næste skridt blandt andet at omsætte opdagelsens mekanisme til en helt ny måde at hæmme quorum sensing-afhængige infektioner. Disse undersøgelser er netop blevet støttet af LEO Fondet, og vil inkludere forsøg på at behandle hudinfektioner i

mus i samarbejde med prof. Hanne Ingmers forskningsgruppe ved Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab, KU.

Derudover vil metoden blive benyttet til hurtig identifikation af flere ukendte signalpeptider i Gram-positive bakterier, som så vil blive korreleret med bakteriernes fylogeni.

Dermed kan man begynde at kortlægge udviklingen af de forskellige quorum sensing systemer, ikke blot på det genomiske niveau, men også rent funktionelt, hvilket tidligere ville have været særdeles ressourcekrævende.



Retsch®
MILLING SIEVING ASSISTING

DiaLabXp
Lokomotivvejskædet • KBH • 24.-26. september 2019
Kom og besøg os på messen
Stand 3034

ab ninolab

NEW DIMENSIONS IN SAMPLE PREPARATION OF FOOD AND FEED

If you are looking for a complete line of products for sample preparation, look no further than RETSCH.



A/S Ninolab - Cordozasvinget 6 - 2680 Solrød Strand
Kontaktperson: Birte Asmussen - Mobil: 2011 1514 - E-mail: birte@skanlab.com - www.retsch.dk