

11

HUMANE PROTEINER ER ANKER FOR BIOFILM

Af

RIKKE LOUISE MEYER

LEKTOR, PH.D.

INTERDISCIPLINARY
NANOSCIENCE CENTER,
AARHUS UNIVERSITET

MODTAGET CARLSBERG-
FONDETS DISTINGUISHED
ASSOCIATE PROFESSOR
FELLOWSHIP TIL PROJEKTET
*THE ROLE OF ADSORBED
PROTEIN CONFORMATION IN
THE RECOGNITION AND
ATTACHMENT OF STAPHYLO-
COCCUS EPIDERMIDIS TO
IMPLANT SURFACES*

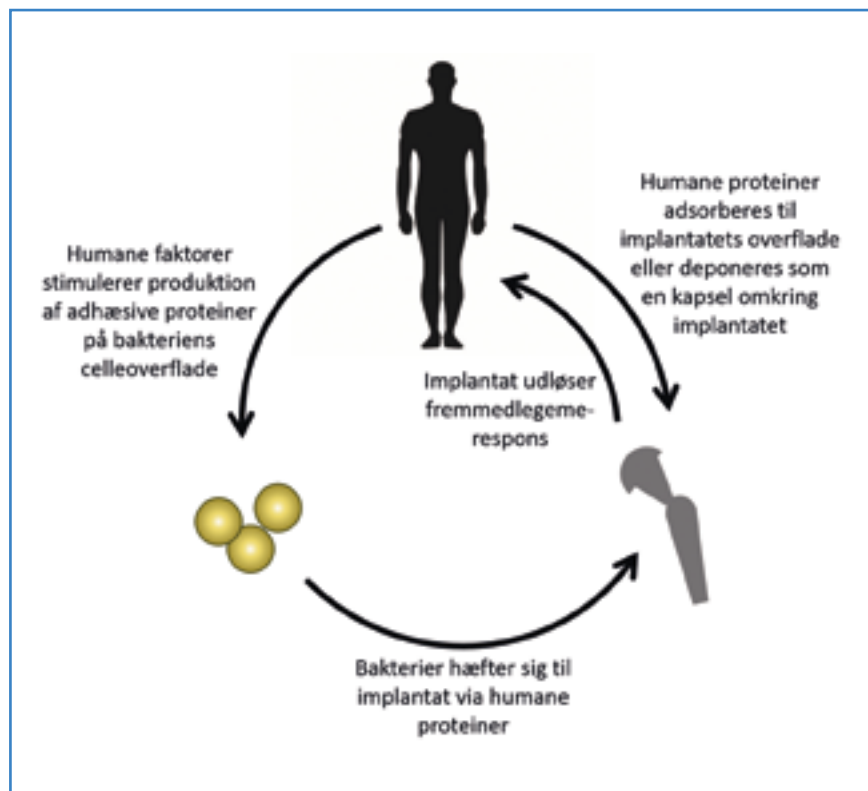
Tusindvis af danskere har i dag glæde af implantater som forbedrer deres livskvalitet. Men implantaterne udgør en livslang infektionsrisiko fordi bakterier der finder vej til implantatet, kan danne en biofilm på implantatoverfladen. Her er de beskyttet mod immunforsvaret og antibiotika. For at forhindre disse alvorlige infektioner undersøger vi en hypotese om at det er kroppens egen reaktion på implantat der åbner døren for at bakterier kan etablere biofilm.

Der er kun få nulevende mennesker som kan huske tiden før opdagelsen og masseproduktionen af penicillin i 1940'erne, hvor simple infektioner kunne lede til en livstruende situation. I dag forventer de fleste at en infektion er hurtigt overstået med en antibiotikakur. Der er dog nogle infektioner som antibiotika aldrig har fået bugt med. Det var i lang tid en gåde hvorfor behandling var virkningsløs over for disse infektioner for hvis man isolerede bakterien fra patienten og testede dens følsomhed, viste resultatet at den med lethed burde kunne slås ned. Det var ikke før i slutningen af 1980'erne at Prof. Bill Costerton fra University of Montana fandt årsagen. Mange bakterier har to måder at leve på: som frit-svømmende enkeltceller eller som flercellede samfund indkapslet i en slimet matrix – en biofilm (se fakta boks). Selv om de er genetisk helt ens, kan bakterierne dybt i en biofilm tåle næsten uanede mængder af antibiotika,¹ og infektioner hvor der dannes biofilm, kan derfor ikke behandles på traditionel vis. I dag, mere end 30 år efter opdagelsen af biofilm, har vi stadig ingen løsning på problemet.

Biofilms høje antibiotika-tolerance er grundlæggende forskellig fra den antibiotika-resistens vi læser om i dagspressen. Antibiotika-resistente bakterier har en genetisk mekanisme som gør dem i stand til enten at neutralisere antibiotika eller undgå at binde til et bestemt antibiotikum. Disse mekanismer er begrænsede til bestemte antibiotika, og det er derfor muligt at behandle infektionen ved at skifte til en anden type. Dette er dog ikke tilfældet for bakterier i en biofilm da de dels er beskyttet af den omgivende matrix og dels er beskyttet ved at gå i en dvaletilstand hvor de tolererer høje koncentrationer af alle typer antibiotika. Derfor vokser biofilmen ufortrødent videre når behandlingen afsluttes og bakterierne genoptager aktivitet.

Implantater er hot-spots for biofilm infektioner

Biofilm etablerer sig som regel på overfladen af fremmedlegemer i kroppen, som for eksempel kunstige hjerteklapper, karproteser, knæ- og hofteproteser eller andre implantater. Da anvendelsen af implantater er stærkt stigende,² følger antallet af biofilminfektioner med. Bakterier hæfter til implantatet og går i gang med slim eller *matrix*-produktion, og dermed lyder startskuddet for en biofilm. Det er ikke kun antibiotika som er virkningsløs over for biofilm – kroppens immunforsvar kan heller ikke få adgang til bakterierne i biofilm. Der skal derfor kun ganske få bakterier til at etablere en infektion når der er et fremmedlegeme til stede,³ og når infektionen er en kendsgerning, er der ikke andre muligheder end at fjerne og erstatte implantatet. Det er en



kostbar og risikofyldt procedure som desværre kun har en beskedent chance for succes.

Biofilm-infektioner søges løst med to tilgange: med udvikling af mere effektive behandlingsmetoder eller med udvikling af nye materialer som er sværere for bakterierne at etablere en biofilm på. For at opnå det sidste skal vi dykke ned i detaljerne om hvordan bakterier hæfter til implantater og starter en biofilm.

Samspelet mellem menneske, implantat og bakterie baner vejen for biofilm

Et stort antal studier har undersøgt hvilke fysiske-kemiske egenskaber der mindsker biofilmdannelse på forskellige materialer i laboratoriet, men resultaterne stemmer sjældent overens med det man ser i klinikken. En vigtig del af ligningen mangler nemlig i mange af denne type studier: patienten. Etablering af en biofilm-infektion omkring et implantat handler ikke kun om interaktionen mellem bakterier og implantat, men også om interaktionen mellem kroppen og implantat, og mellem kroppen og bakterier (Figur 1).

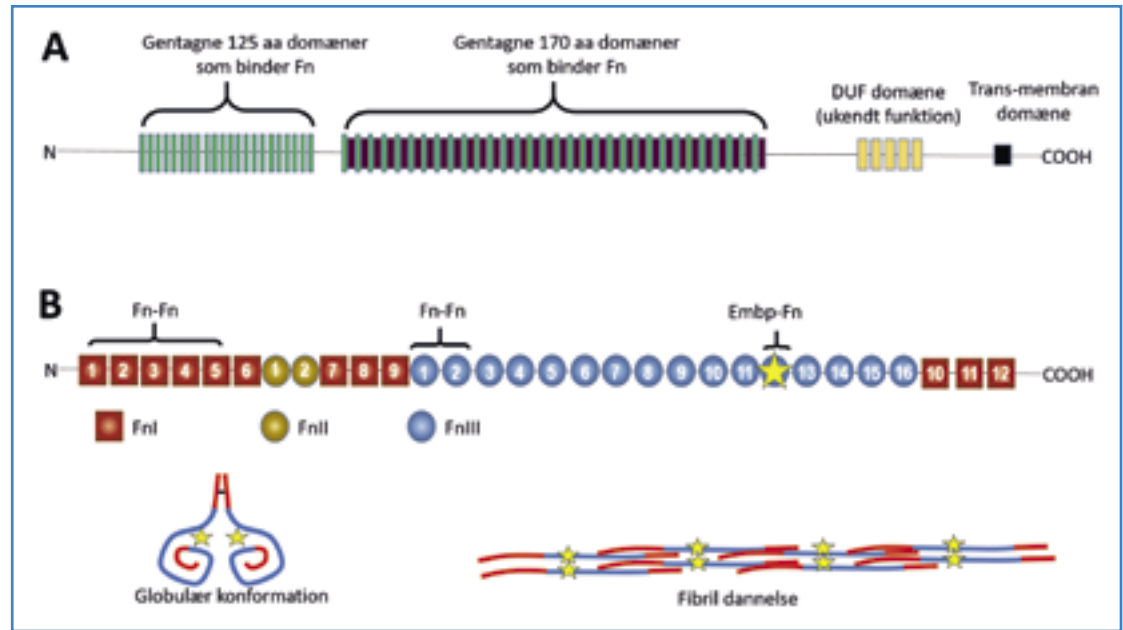
Staphylococcus aureus og *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) er tilsammen ansvarlige for langt de fleste implantat-relaterede infektioner,⁴ men de binder ikke direkte på implantatet. Umiddelbart efter at implantatet sættes ind i kroppen, danner humane proteiner – fx fibronectin, fibrinogen, collagen og elastin – et tyndt lag på implanta-

Figur 1. Samspelet mellem patient, implantat og bakterie ved etablering af en biofilm-infektion.

“
Etablering af en biofilm-infektion handler ikke kun om interaktionen mellem bakterie og implantat, men også om interaktionen mellem kroppen og implantat, og mellem kroppen og bakterier
 ”

Figur 2.

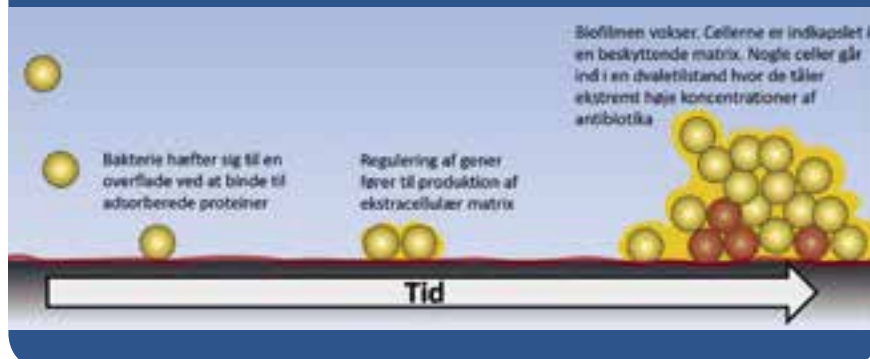
A) Strukturen af *S. epidermidis* Embp som binder til Fibronektin.
 B) Strukturen af Fibronektin (Fn) med angivelse af de domæner som binder andre Fn molekyler, eller som binder til Embp (stjerne). Fn findes rullet sammen i en globulær konformation når det er opløst, men når strukturen åbnes op, dannes fibriller. Dette sker fx på overfladen af humane celler eller på materialer med bestemte egenskaber.



**Vores observationer afslører et helt grundlæggende ubesvaret spørgsmål:
 Hvilke forhold afgør om bakterier kan binde til de humane proteiner på
 implantatets overflade og tage det første skridt mod en biofilm?**



Hvad er en biofilm? Mange bakterier er i stand til at hæfte sig fast til forskellige materialer og danne en flercellet struktur af bakterier indkapslet i en slim eller *matrix* de udskiller. Infektioner omkring implantater skyldes ofte biofilm på implantatets overflade og i det omkringliggende væv. Biofilmen-infektioner er svære at kurere da matrixen skærmer bakterierne mod kroppens immunceller. Nogle bakterier dybt i biofilmen går også i en dvale-tilstand (vist som røde celler), hvor de ikke er følsomme overfor antibiotika. Antibiotika-behandling kan derfor ikke fjerne infektionen helt da de overlevende bakterier vokser videre når behandlingen ophører, og de bliver aktive igen.



tets overflade, og *Staphylococcus* har et arsenal af receptorer på celleoverfladen som binder specifikt til disse proteiner. Det er de humane proteiner som er afgørende for at bakterien kan hæfte sig. Men hvorfor kan bakterien udnytte denne interaktion hvis de samme proteiner findes i stort antal i den omkringliggende væske? Receptorerne burde være optaget allerede inden bakterien møder implantatet. Og hvorfor observerer vi at humane proteiner hæmmer bakteriers vedhæftning til visse materialer i stedet for at fremme den?

Vores observationer afslører et helt grundlæggende ubesvaret spørgsmål: Hvilke forhold afgør om bakterier kan binde til de humane proteiner på implantatets overflade og tage det første skridt mod en biofilm? I proteinernes verden dikteres funktion ud fra form. Proteinernes funktion er derfor meget følsomme over for små ændringer i deres konformation, dvs. deres rumlige struktur. Vores hypotese er at humane proteiner ændrer konformation når de hæfter sig til overflader, og vi mener at denne konformationsændring er afgørende for om bakterier kan binde proteinerne og hæfte sig til overfladen. Hvis vi forstår hvordan implantatets egenskaber dikterer sammensætningen og konformation af de humane proteiner på implantatet, er der et potentiale for at designe materialer som ikke udstiller de proteiner som bakterierne søger.

Blotlægning af gemte bindingsdomæner afgør om et protein fremmer eller hæmmer vedhæftning af bakterier

For at teste vores hypotese undersøger vi hvordan *S. epidermidis* hæfter sig til implantater via det humane protein fibronektin (Fn). *S. epidermidis* binder

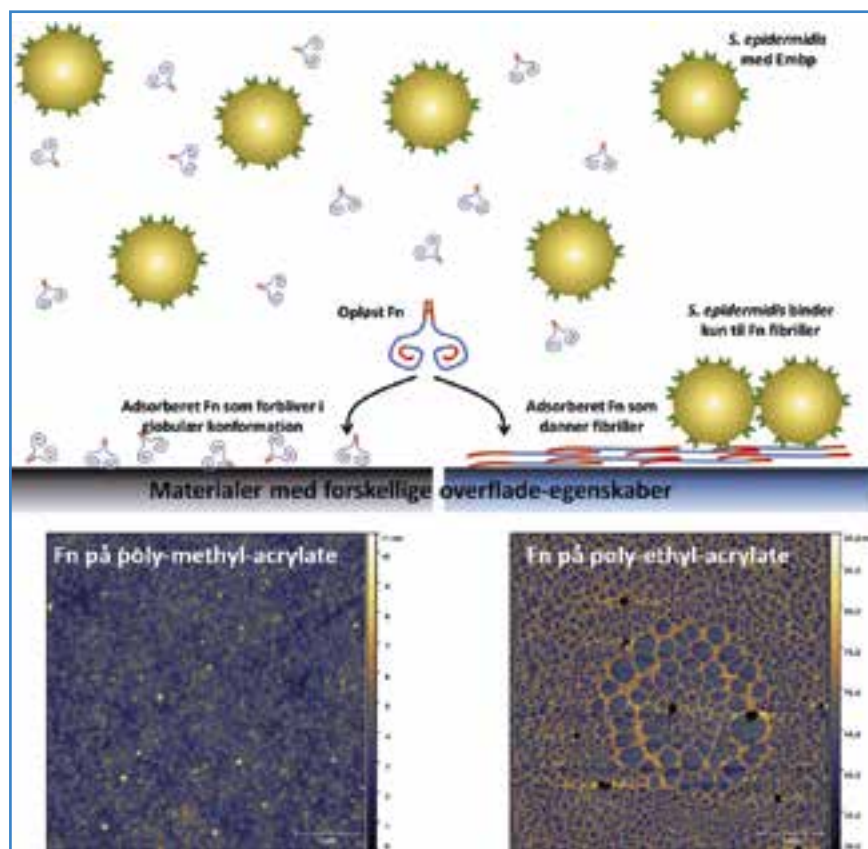
Fn via en receptor som hedder *extracellular matrix binding protein* (Embp). Embp er et stort protein som sidder på bakteriers celleoverflade, og det indeholder en lang række af identiske Fn-bindende domæner (Figur 2A). Bindingen til Fn har indtil videre kun været testet mod Fn som var immobiliseret på en overflade, og vi har for nylig vist at *S. epidermidis* ikke binder Fn som er i opløsning. Opløst Fn har en rund, globulær konformation, men når Fn adsorberes til en overflade, kan det ændre konformation så det foldes ud og danner lange fibriller. Dette sker fordi domænerne der binder til andre Fn-molekyler, bliver blotlagt (Figur 2B).

Vi ved at Embp binder til det domæne på fibronectin som hedder FnIII_{2,5} og vores hypotese er at dette domæne kun er tilgængeligt når Fn danner fibriller (Figur 3). Vi har etableret et modelsystem med polymer-coatede materialer som lader Fn hæfte sig i enten globulær konformation eller som fibriller. Vores forskning viser at hypotesen holder stik. Embp kan kun facilitere bakteriens vedhæftning til materialer hvor Fn forlader den globulære konformation og danner fibriller (Figur 3). Materialets overfladekemi og struktur er afgørende for om Fn danner fibriller, og hvordan fibrillerne fordeles på implantatet. Derudover har implantatets mekaniske og kemiske egenskaber betydning for hvordan kroppen reagerer imod implantatet og deponerer Fn og fibrin på det.

Vores forskning giver således ny viden om samspillet mellem kroppen, implantatet og bakterierne. Denne viden er essentiel for design af nye materialer som optimerer integrationen af implantatet i kroppen og samtidig minimerer risikoen for biofilminfektioner.

Noter

- 1 Stewart, P.S.; Costerton, J.W., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, 358 (9276), 135-138.
- 2 UNJ Registry, UK. <http://www.njrcentre.org.uk/njrcentre/Reports,PublicationsandMinutes/Annualreports/tabid/86/Default.aspx>
- 3 W. Zimmerli, F.A. Waldvogel, P. Vaudaux, U.E. Nydegger Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *The Journal of Infectious Diseases*, 146 (4) (1982), pp. 487-497.
- 4 Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Ehrlich, G.D.; Montanaro, L., Biofilm-based implant infections in orthopaedics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015; Vol. 830, pp 29-46.
- 5 Christner, M., G.C. Franke, N.N. Schommer, U. Wendt, K. Wegert, P. Pehle, G. Kroll, C. Schulze, F. Buck, D. MacK, M. Aepfelbacher and H. Rohde (2010). "The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin." *Molecular Microbiology* 75(1): 187-207.



Figur 3.

S. epidermidis kan ikke binde til opløst Fn. Kun når Fn antager den rette konformation, kan *S. epidermidis* binde via Embp. Materialets egenskaber påvirker derfor bakteriens vedhæftning fordi de afgør om der dannes Fn-fibriller. Små forskelle kan være afgørende. Nedenfor ses atomic force mikroskopi-billeder af globulær-Fn og fibril-Fn på overflader belagt med hhv. poly-methyl-acrylat og poly-ethyl-acrylat.



Hvis vi forstår hvordan implantatets egenskaber dikterer sammensætningen og konformation af de humane proteiner som hæfter sig til overfladen, er der et potentiale for at designe materialer som ikke udstiller de proteiner bakterierne søger.

