Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/58445

File ID	58445
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Colonization and invasion of human epithelia by Neisseria meningitidis. Bacterial surface variation and exploitation of host defense molecules
Author	F.P. de Vries
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2001
Pages	160

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/91927

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting

Neisseria meningitidis is de belangrijkste verwekker van bacteriële meningitis (hersenvliesontsteking) bij de mens. Door het snelle verloop en de vaak zeer ernstige verschijnselen wordt meningokokkenziekte alom gevreesd. De menselijke nasofarynx (neus-keelholte) is de natuurlijke verblijfplaats en enig bekende reservoir van waaruit de bacterie overgedragen kan worden naar andere mensen. Deze transmissie route is erg efficiënt en resulteert in een dragerschap van 5-15% van de totale menselijke populatie. Omdat de bacterie buiten het menselijk lichaam niet kan overleven, verwachten we een sterk negatieve selectie van meningokokken die zeer virulent (ziek makend) zijn, omdat dood of ziekte verdere verspreiding van de bacterie naar andere dragers stopt of sterk verminderd. Dit wordt weerspiegeld in het feit dat dragerschap normaal asymptomatisch verloopt. Incidenteel wordt het evenwicht tussen afweer van de gastheer en bacterie verstoord en kunnen de meningokokken zich verspreiden naar de bloedbaan en uiteindelijk naar het centrale zenuwstelsel, waardoor sepsis (bloedvergiftiging) of meningitis kan ontstaat. De vraag of specifieke gebeurtenissen en/of bepaalde bacteriële virulentie factoren verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van meningokokkenziekte is moeilijk te beantwoorden, doordat kennis en begrip van de interactie tussen gastheer en bacterie, zowel gedurende normale kolonisatie (dragerschap) als wel direct voorafgaand aan het uitbreken van de ziekte, onvolledige is. Hechting aan en invasie (binnendringen) van epitheelcellen van de neus-keelholte zijn waarschijnlijk verschijnselen van een normaal kolonisatie proces van de gastheer, waaraan meningokokken optimaal zijn aangepast in verloop van de evolutie. Anderzijds kan het binnendringen van de bacteriën in gastheercellen een mechanisme zijn dat bijdraagt aan het passeren van de epitheel barrière van de neus-keelholte, een logische eerste fase in een proces dat kan leiden tot verspreiding van bacteriën vanuit de keel naar de bloedbaan. Vanuit dit oogpunt, behoren oppervlaktestructuren van de meningokok die bacteriële invasie van gastheercellen induceren te worden beschouwd als virulentie factoren.

Een groot probleem bij het identificeren van zulke potentiële virulentie factoren is de uitgebreide antigene (immunologisch specifieke) variatie en wisselende expressie (aan/af schakelen) van oppervlakte structuren. Deze variaties treden op tussen meningokokken van verschillende stammen als wel tussen bacteriën binnen een stam, en zowel gedurende dragerschap als tijdens ziekte. De algemene gedachte is dat deze variabiliteit de bacteriën in staat stelt om aan de humane afweer te ontkomen. Een alternatieve uitleg is dat deze

fenotypische (verschijningsvorm) variatie een functionele aanpassing is aan de wisselende omstandigheden waaraan de bacteriën blootgesteld zijn gedurende kolonisatie. Om de interacties van meningokokken met gastheercellen op de plaats van initiële kolonisatie te kunnen onderzoeken, ontwikkelden we een nieuw experimenteel model, monolayers van primair gekweekte epitheelcellen afkomstig van de humane neus-keelholte. Meningokokken zoals aangetroffen in de bloedbaan of hersenvocht van patiënten zijn typisch voorzien van een polysaccharide kapsel en pili en bezitten een type LPS (lipopolysaccharide) met eindstandige siaalzuur groepen. Experimenten beschreven in hoofdstuk 2 tonen aan dat dit type meningokok niet in staat is epitheelcellen van de nasofarynx binnen te dringen. Teneinde dit epitheel te kunnen invaderen, dienden de bacteriën meerdere oppervlaktestructuren aan- of juist uit te schakelen (fase variatie), resulterend in het verlies van het kapsel en pili, een verandering in lipopolysaccharide opbouw en de expressie van een nieuw, 28-kDa Opacity (adhesine) buitenmembraan eiwit. Meningokokken met dit invasieve fenotype worden algemeen als niet virulent beschouwd doordat ze, hoewel dikwijls geïsoleerd van de nasofarynx van dragers, niet worden aangetroffen in het bloed of hersenvocht van meningitis patiënten. Echter, het vermogen om in grote getale het nasofarynx epitheel te invaderen, maakt dit fenotype bij uitstek geschikt om de disseminatie van de keel naar de bloedbaan te initiëren. De verandering in expressie van elk van de bacteriële oppervlakte structuren, na de overgang naar een invasief fenotype heeft functionele consequenties voor het gedrag van de bacterie in de neus-keelholte.

Pili zijn de eerste bacteriële organellen die contact maken met het humane epitheel en zijn onmisbaar voor hechting van gekapselde meningokokken. Meningokokken die werden geïsoleerd vanuit de intracellulaire omgeving van nasofarynx cellen waren niet meer gepileerd. Dit was het gevolg van het niet langer tot expressie brengen van het PilC eiwit (Hoofdstuk 2). Het mechanisme waardoor de expressie van PilC wordt gereguleerd is gebaseerd op het voorkomen van een homopolymere (herhaling van identieke of groepsgewijs repeterende) reeks nucleotiden (DNA basen). Verandering in het aantal repeterende basen kan leiden tot het aan- of uitschakelen van de pilC productie. Opmerkelijk genoeg zijn soortgelijke mechanismen verantwoordelijk voor variatie in kapsel, Opa en Opc eiwitten en LPS productie. Signalen die een gelijktijdige variatie van deze oppervlakte structuren kunnen induceren zijn geheel onbekend. Gepileerde bacteriën zijn in staat gastheercellen te prikkelen, waarna de gastheercel op zijn beurt een signaal naar de bacterie zou kunnen sturen (molecular cross-talk), dat resulteert in verandering van het bacteriële fenotype, inclusief het verdwijnen van de pili zelf. Anderzijds zouden bacteriën kunnen reageren op veranderingen in de directe

omgeving met een verhoogde variatie frequentie. Echter, ook een reeks volkomen toevallige gebeurtenissen binnen de bacterie-populatie, gevolgd door selectie van een bepaald voordelig fenotype kan niet worden uitgesloten.

De overgang naar een ongekapselde vorm is noodzakelijk om invasieve meningokokken te doen ontstaan. Het verlies van een kapsel betekent echter tevens dat bacteriële antigenen (immunologisch herkenbare structuren) op de celwand onder het kapsel worden blootgesteld aan het humane afweer systeem. In vivo zijn ongekapselde bacteriën echter goed instaat om te overleven in de neus-keelholte. Mogelijk is dit het gevolg van de aanwezigheid van microkolonies van bacteriën aan het oppervlak van de epitheelcellen (Hoofdstuk 2). In een later stadium van infectie is de (her)expressie van kapsel noodzakelijk om de bacteriën te laten overleven in de bloedbaan. Net als op epitheel niveau, zou de vorming van microkolonies van gekapselde bacteriën aan het endotheel oppervlak het ontstaan van ongekapselde bacteriën in de diepere lagen van deze kolonies en daarmee passage door het endotheel en voortgaande verspreiding van de bacteriën mogelijk kunnen maken. Deze overwegingen geven aan, dat variatie van kapselexpressie cruciaal is voor het ontstaan van meningokokkenziekte.

Het vrijkomen van meningokokken endotoxine in de bloedbaan is de voornaamste oorzaak voor het fulminante verloop van meningokokkenziekte. Tijdens een natuurlijke infectie is het LPS van meningokokken in bloed of hersenvocht praktisch altijd gesialyleerd, terwijl het LPS van nasofarynx isolaten dikwijls geen siaalzuur bevat. Sialylering heeft een remmend effect op het vermogen van de bacteriën om epitheelcellen te invaderen. Deze remming kan veroorzaakt worden door afscherming van cel-bindings plaatsen (receptoren) op Opa/Opc eiwitten en/of door neutralisatie van de bacteriële oppervlakte lading (Hoofdstuk 3). Resultaten beschreven in hoofdstuk 2 geven aan dat verlies of reductie van LPS sialylering een voorwaarde is voor het ontstaan van meningokokken die in grote getale nasofarynx cellen kunnen invaderen via een Opa/Opc afhankelijk mechanisme. Het verlies van siaalzuur door invasieve meningokokken was het gevolg van een verandering in de carbohydraat (suiker) structuur van het LPS, waardoor een eindstandige (galactose) siaalzuur acceptor ontbreekt.

Middels karakterisatie en vervolg-experimenten aan bacteriën verkregen vanuit de intracellulaire omgeving van verschillende infectie-modellen, zoals beschreven in hoofdstuk 2, werd bevestigd, dat Opa en Opc belangrijke aanhectingsfactoren (adhesinen) zijn van de meningokok. In het nasofarynx epitheel model bleek een 28-kDa Opa eiwit onmisbaar voor meningokokken invasie, terwijl Opc een modulerende rol vervulde. In de Chang-, Hec-1B- en NCI epitheelcel infectie-modellen kwam Opc naar voren als het belangrijkste invasie

inducerende eiwit. Deze resultaten suggereren dat het 28 kDa Opa eiwit en Opc weefsel-specificiteit bezitten en wellicht verschillende receptoren herkennen. Uit resultaten beschreven in hoofdstuk 3 blijkt dat meningokokken die Opc produceren heparan-sulfaat bevattend proteoglycaan (HSPG) receptoren op het oppervlak van gastheercellen herkennen en gebruiken om toegang te krijgen tot de epitheelcellen. Meningokokken met Opa-28kDa eiwit op het oppervlak binden zowel aan varianten van de "carcinoembryonic antigen" (CEACAM, CD66) familie als aan HSPG receptoren. In tegenstelling tot Opc wordt binding van Opa-28kDa aan HSPG receptoren niet gevolgd door invasie van de bacteriën. Opa 28-kDa en Opc binden mogelijk met een verschillende affiniteit aan een zelfde klasse HSPG receptors, of waarschijnlijker, aan een verschillend type HSPG receptor, en zijn dus inderdaad specifiek voor bepaalde weefsels met betrekking tot hun invasie inducerend vermogen.

Humane afweermechanismen die uitzaaiing van de bacteriën en het uitbreken van meningokokkenziekte kunnen tegengaan zijn ondermeer een effectieve humorale (antilichaam) en cellulaire immuniteit en het onschadelijk maken van de bacteriën door fagocyten. Op het niveau van de luchtwegen zijn een intacte epitheel-barriere, en de aanwezigheid van geactiveerde neutrofiele leukocyten (witte bloedcellen), waarschijnlijk zeer belangrijk om (voortgaande) infectie en verspreiding van bacteriën vanuit de nasopharynx te voorkomen. Een belangrijk verdedigingsmechanisme van neutrofiele granulocyten is gelegen in cytoplasmatische granula (korrels) die een bonte verzameling proteases (eiwit afbrekende enzymen) en anti-bacteriële eiwitten bevatten. Het merendeel van deze verbindingen komt in fagolysosomen (verterings blaasjes in de witte bloed cellen) terecht, maar tijdens het proces van activatie en degranulatie kan een belangrijk deel van de granula-inhoud vrijkomen in de extracellulaire omgeving. In hoofdstuk 4 onderzochten we de mogelijkheid dat neutrofielen bijdragen aan het voorkómen van meningokokkenziekte, met name door te onderzoeken of neutrofiele granula componenten de interactie tussen meningokokken en epitheelcellen kunnen verstoren. Onverwacht vonden we dat meningokokken in plaats van gedood te worden door granula-eiwitten, in staat waren om de granula peptiden (defensins HNP 1-3) te gebruiken om in grote getale epitheelcellen te invaderen. Het is duidelijk dat een dergelijk mechanisme kan bijdragen aan de persistentie (aanwezig blijven) of verdere verspreiding van meningokokken in de gastheer.

Laatst genoemde bevindingen en de observatie dat een ander, volkomen niet verwant maar ook cationisch (positief geladen) en amfipatisch (water en vet oplosbaar) anti-bacterieel eiwitje, Polymyxine B een soortgelijk invasie-stimulerend effect vertoonde was een aansporing het moleculaire mechanisme achter dit type hechting en invasie verder te

bestuderen. Kinetische studies in hoofdstuk 5 wezen uit dat defensins allereerst een reversibele bacteriële binding aan de Chang epitheelcellen bewerkstelligden. Deze gebeurtenis was onafhankelijk van bacterie- of gastheercel metabolisme of eiwit synthese en vond zelfs plaats bij 4°C. Na verloop van tijd volgde een overgang naar een irreversibele binding aan het oppervlak van de Chang cellen, bij 37°C gevolgd door het verschijnen van intracellulaire bacteriën. Door middel van confocale microscopie werd duidelijk dat deze irreversibele hechting en invasie samenvielen met een redistributie en concentratie van de oorspronkelijk diffuus gebonden defensin moleculen op plaatsen waar gehechte bacteriën contact maakten met de gastheercellen. Deze observaties ondersteunen de hypothese dat de bacterie- gastheercel interacties berusten op de vorming van aggregaten van dicht opeen gepakte defensin dimeren, ingebed tussen de tegenover elkaar gelegen bacterie- en gastheercel membranen. In tegenstelling tot de HNP-gemedieerde hechting, zijn er voor bacteriële invasie actief metaboliserende gastheercellen, proteïne fosforylering en een intact cytoskelet nodig. Infectie experimenten met meningokokken mutanten (inclusief *porA* en *porB* negatieve mutanten) wezen uit dat het invasie-stimulerende effect van HNPs aanzienlijk (tot 75%) was gereduceerd in meningokokken die het PorB buiten membraan porine eiwit misten. Deze resultaten suggereren dat de infectie-stimulerende effecten van defensins berusten op het induceren van een volstrekt nieuw mechanisme van bacteriële hechting en invasie. Daarnaast onderstrepen deze bevindingen het potentiële belang van "niet chromosomale" virulentie mechanismen in de bacteriële pathogenese. Bovendien zijn de onderliggende mechanismen van belang voor de voortgaande ontwikkeling en therapeutische toepasbaarheid van dergelijke anti-bacteriële eiwitten als antibiotica.