



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Platelets: versatile effector cells in pneumonia and sepsis

de Stoppelaar, S.F.

**Publication date**

2015

**Document Version**

Final published version

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

de Stoppelaar, S. F. (2015). *Platelets: versatile effector cells in pneumonia and sepsis*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam]. Uitgeverij BOXPress.

**General rights**

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 than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## **Addendum**

## Nederlandse samenvatting

Pneumonie (longontsteking) is een infectieziekte die ontstaat wanneer een pathogeen de luchtwegen binnendringt en daar een ontsteking veroorzaakt. Pneumonie kan veroorzaakt worden door bacteriën, virussen of zeldzame ziekteverwekkers zoals een schimmel. Door de ontstekingsreactie worden immuun cellen naar de longen gerekruteerd, om de ziekteverwekker op te ruimen. Deze reactie gaat gepaard met vochtophoping in de longen, waardoor ademen bemoeilijkt kan worden. Als de ziekteverwekker niet wordt overwonnen door het immuunsysteem, kan deze door de longbarrière heen breken en sepsis (bloedvergiftiging) veroorzaken. Dit is een zeer ernstige aandoening, waarbij het lichaam heftig reageert op het pathogeen in de bloedbaan. De ziekteverschijnselen tijdens sepsis worden vaak zelfs met name veroorzaakt door de reactie van de gastheer, niet door het pathogeen zelf. Er ontstaat een situatie van hyperinflammatie, maar ook immuun suppressie kan een rol spelen. Door de systemische activatie van het immuunsysteem, en de schade die dit oplevert, zal ook het stollingssysteem geactiveerd raken. Hierdoor kunnen stolsels in bloedvaten in organen ontstaan. Uiteindelijk kunnen de verlaagde bloeddruk, schade ten gevolge van de inflammatie en stolsels in de bloedtoevoer leiden tot uitval van vitale organen. Longontsteking heeft van alle infectieziekten het vaakst de dood tot gevolg. Bij een patiënt met sepsis is de kans op fatale afloop ondanks verzorging op *Intensive Care Units* in de Westerse wereld nog steeds 20 tot 30 procent.

Bloedplaatjes zijn kleine kernloze cellen in de bloedbaan. Ze worden in grote aantallen afgescheiden door megakaryocyten in het beenmerg - normale bloedplaatjes aantallen variëren van  $150-300 \times 10^9$  cellen per liter bloed. Bloedplaatjes zijn bekend vanwege hun sleutelrol in de bloedstolling. Onderzoek van de afgelopen tientallen jaren heeft echter nog een rol voor bloedplaatjes aan het licht gebracht: in de afweer. Tijdens longontsteking en sepsis treedt door de stollingsactivatie activatie van bloedplaatjes op, daarnaast kunnen bloedplaatjes direct door verscheidene bacteriën geactiveerd worden. Door hun grote aantal en gevoeligheid doen bloedplaatjes goed dienst als *sentinel cells*. Na activatie scheiden bloedplaatjes immuun regulerende eiwitten uit, of binden ze zich aan witte bloedcellen. Bloedplaatjes in complex met witte bloedcellen dragen bij aan rekrutering van immuun cellen naar een infectieus orgaan en hebben een regulerende rol in de afweerfunctie van de witte bloedcellen. Deze eigenschappen maken bloedplaatjes van belang bij de initiële afweer tegen een pathogeen. Tijdens sepsis echter, wanneer de reactie van de gastheer op een ziekteverwekker te hevig is en activatie van de bloedstolling een probleem vormt, dragen bloedplaatjes juist bij aan de ontwikkeling van ziekteverschijnselen.

In dit proefschrift hebben we de rol van bloedplaatjes tijdens longontsteking en sepsis onderzocht aan de hand van muismodellen. We hebben bijvoorbeeld bloedplaatjes gedepleteerd in muizen en daarna een longontsteking veroorzaakt met twee verschillende

ziekteverwekkers (*Klebsiella pneumoniae* en *Streptococcus pneumoniae*; **hoofdstukken 3 en 4**). De uitkomst van deze studies waren dat bloedplaatjes gedepleteerde muizen hogere bacteriële uitgroei in hun organen hadden en eerder stierven dan de controle muizen. Opvallend was dat muizen geen last hebben van de bloedplaatjes depletie alléén, maar dat bloedplaatjesdepletie in combinatie met infectie hevige longbloedingen veroorzaakt. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat een kleine restpopulatie bloedplaatjes van 1 tot 9 procent voldoende was om de longbloedingen als gevolg van de infectie te voorkomen. Deze groep muizen was echter nog steeds in het nadeel tijdens longontsteking met hogere bacteriële uitgroei en snellere sterfte dan de controle muizen. Dit illustreert dat de bloedplaatjes niet alleen een rol hebben bij het stelpen van bloedingen tijdens infectie, maar ook een rol in de afweer omdat de lage bloedplaatjes aantallen blijkbaar onvoldoende waren om de bacteriële groei te remmen.

In andere hoofdstukken dit proefschrift hebben we meer gefocust op specifieke onderdelen van bloedplaatjes die van belang zouden kunnen zijn bij hun rol in de afweer. In **hoofdstuk 5** hebben we gekeken naar P-selectine, een eiwit dat door bloedplaatjes en endotheelcellen wordt uitgescheiden en van belang is bij de interactie van deze celtypen met witte bloedcellen. Uit deze studies blijkt dat zowel bloedplaatjes- als endotheelcel P-selectine van belang is voor de immunerespons tijdens longontsteking en sepsis. Als bijzondere observatie in deze experimenten vonden we dat de complexen tussen bloedplaatjes en monocytten (een bepaald type witte bloedcellen) verminderd aanwezig waren in muizen die *knock out* waren voor P-selectine. Na 12 en 48 uur infectie was dit geassocieerd met verhoogde cytokine productie in P-selectine *knock out* muizen. Samen suggereert dit dat P-selectine betrokken is bij de interactie die bloedplaatjes en monocytten met elkaar aangaan tijdens *Klebsiella* pneumosepsis, en dat dit het inflammatoire profiel van monocytten beïnvloedt.

In de **hoofdstukken 6 en 7** hebben we de rol van zogenaamde *Toll-like* receptoren (TLRs) op bloedplaatjes onderzocht. TLRs zijn immuun receptoren die functioneren als satellieten op immuun cellen of epitheelcellen en specifieke patronen aanwezig op ziekteverwekkers detecteren. Wanneer TLRs daardoor geactiveerd raken lokken ze een immuunreactie uit. Er is in de literatuur veel bewijs voor een rol van bloedplaatjes specifieke TLRs in de afweer. Wij hebben bloedplaatjes TLR signalering onder andere onderzocht door het gezamenlijke signaleringseiwit MyD88 te bestuderen. *Myd88 knock out* muizen (die functioneel deficiënt zijn voor TLRs) zijn zeer in het nadeel tijdens longontsteking en sepsis. Bloedplaatjes-specifieke *Myd88 knock out* muizen bleken, net als volle *Myd88 knock out* muizen, verminderd responsief te zijn in de initiële immuunreactie tegen *Klebsiella*. Het verschil vergeleken met de controle muizen was echter bescheiden en bleek niet van belang te zijn voor latere bacteriële uitgroei tijdens longontsteking of sepsis.

Bloedplaatjes worden tijdens infectie ook geactiveerd door trombine, een enzym dat door activatie van de stollingscascade in het bloed vrijkomt. Bloedplaatjes activatie door trombine gebeurt via zogenaamde Protease geactiveerde receptoren (PARs), waarvan er 4 typen beschreven zijn. PAR4 is de enige PAR die tot expressie komt op muizenbloedplaatjes, daarom hebben wij *Par4 knock out* muizen onderzocht tijdens (**hoofdstuk 8**). *Par4 knock out* muizen bleken in het nadeel tijdens longontsteking. Ze hadden hogere bacteriële uitgroei in organen, meer schade van de longontsteking en een verminderde immuunreactie in een *in vitro* stimulatie systeem. Omdat PAR4 behalve op bloedplaatjes ook nog op andere immuun- en endotheelcellen tot expressie komt, zou verdere studie nodig zijn om het celtype dat dit nadeel veroorzaakte te identificeren.

**Hoofdstuk 9** is een beschrijvende studie, die bloedplaatjes remmende medicatie in een prospectief geïncludeerde patiëntengroep met sepsis retrospectief onderzoekt. Onze hypothese was zoals eerder genoemd dat bloedplaatjes betrokken zijn bij de ontwikkeling van sepsis complicaties. Er is een grote groep mensen die bloedplaatjes remmende medicijnen gebruikt, bijvoorbeeld vanwege een hartaandoening. Deze mensen zijn vergeleken met controle patiënten in het MARS sepsis cohort. Er was echter geen verschil in ziekte presentatie, orgaan falen, shock of mortaliteit tussen patiënten die bloedplaatjes remmende medicatie gebruikten en patiënten die dit niet deden. Dit laatste hoofdstuk suggereert dus dat in de heterogene sepsis populatie, met verschillende ziekteverwekkers en verschillende organen waaruit de sepsis ontstaat, het remmen van de bloedplaatjes geen verschil maakt in ziekte uitkomst.

## Conclusie

De laatste jaren is duidelijk geworden dat bloedplaatjes niet alleen een rol spelen in bloedstolling, maar ook een duidelijke taak hebben in de afweer tegen vele soorten infecties. Dit proefschrift draagt bij aan dat inzicht op het gebied van ernstige bacteriële infectie. Muizen met lage bloedplaatjes aantallen zijn kwetsbaarder voor pneumonie: ze hebben hogere bacteriële uitgroei in organen en sterven sneller. Aan de andere kant zagen we in deze thrombocytopenie muizen dat bloedplaatjes juist bijdragen bij aan orgaan schade tijdens sepsis. Dit illustreert de duale rol die bloedplaatjes activatie tijdens ernstige infecte vervult. Onderzoek in de toekomst zal verder uitwijzen welke signalering *pathways* en welke effector functies van bloedplaatjes hiervoor verantwoordelijk zijn.

## Curriculum Vitae

Sacha Francien de Stoppelaar was born in Amsterdam, the Netherlands, on August 12<sup>th</sup> 1985. She grew up in Bloemendaal with her parents and two brothers. In 2003 she graduated from high school (Stedelijk Gymnasium) and moved to Amsterdam to start with Medical School at the University of Amsterdam – Academic Medical Center (AMC). During this period she also followed a minor Modern History at the University of Amsterdam and got interested in Tropical Medicine during internships in Nepal and Tanzania. Her love for basic science started in her fourth year of her study, during an internship at the Children's Hospital (Harvard University, Boston) investigating isolation of the stomach stem cell.

After obtaining her qualification as a medical doctor in 2010 she applied for the AMC PhD Scholarship and used this grant for her PhD project at the Department of internal medicine, under supervision of prof. dr. Tom van der Poll and dr. Cornelis van 't Veer. Her project focused on the role of platelets in host defense during pneumonia induced sepsis and resulted in this thesis: *Platelets: versatile effector cells in pneumonia and sepsis*.

In October 2014 she started her residency Internal Medicine at the AMC in Amsterdam (supervisor dr. S.E. Geerlings) and at the Flevoziekenhuis in Almere (supervisors dr. S. Peters and dr. J. Branger).

Madelon Minneboo, paranimf

## Portfolio

	Year	ECTS credits
<b>Orals and Posters</b>		
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH). Oral presentation: "Platelets contribute to host defense and local haemostasis in gram-negative pneumonia derived sepsis in a MyD88-independent and P-selectin dependent manner".	2014	0.5
24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Poster presentation: "Platelets contribute to host defence and local haemostasis in gram-negative pneumonia derived sepsis".	2014	0.5
24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Poster presentation: "Platelet MyD88 signalling is not involved in host defence during gram-negative pneumonia derived sepsis".	2014	0.5
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH). Oral presentation: "Protease Activated Receptor 4 contributes to host defense in <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced pneumonia".	2013	0.5
15th International Congress of Immunology (ICI). Poster presentation: " <i>Streptococcus pneumoniae</i> triggers platelet activation and platelet-leukocyte complex formation in a capsule dependent and TLR independent manner".	2013	0.5
15th International Congress of Immunology (ICI). Poster presentation: "Protease Activated Receptor 4 contributes to host defense in <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced pneumonia".	2013	0.5
15th International Congress of Immunology (ICI). Poster presentation: " <i>Streptococcus pneumoniae</i> serine protease HtrA, but not SFP or PrtA, is a major virulence factor in pneumonia".	2013	0.5
XXIV congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Poster presentation: "Protease Activated Receptor 4 contributes to host defense in <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced pneumonia".	2013	0.5
XXIV congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Poster presentation: " <i>Streptococcus pneumoniae</i> triggers platelet activation and platelet-leukocyte complex formation in a capsule dependent and TLR independent manner".	2013	0.5
7 <sup>th</sup> Seventh International Shock Congress. Poster presentation: "Streptococcus pneumoniae triggers platelet activation and platelet-leukocyte complex formation in a capsule dependent and TLR independent manner".	2012	0.5
7 <sup>th</sup> Seventh International Shock Congress. Poster presentation: "Protease Activated Receptor 4 contributes to host defense in <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced pneumonia".	2012	0.5
<b>Congresses and symposia</b>		
24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Barcelona, Spain	2014	1.25
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH), Koudekerke	2014	0.5
15th International Congress of Immunology (ICI), Milan, Italy	2013	1.25
XXIV congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Amsterdam	2013	1.25
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH), Koudekerke	2013	1.0

---

7th Seventh International Shock Congress, Miami, United States of America	2012	1.25
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH), Koudekerke	2012	1.0
XXIII congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Kyoto, Japan	2011	1.25
Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH), Koudekerke	2011	1.0
Monthly CEMMposium, Academic Medical Center, Amsterdam	2010-2014	1.0
Weekly Journal club, Academic Medical Center, Amsterdam	2010-2014	1.0

### **Masterclasses**

Academic Medical Center, Amsterdam. Masterclass professor Klaus T. Preissner	2013	0.2
Academic Medical Center, Amsterdam. Masterclass professor Charles T. Esmon	2012	0.2

### **Courses**

Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH), Koudekerke. Three years PhD student course "Thrombosis and Hemostasis".	2011-2013	see above
AMC Graduate School, Academic Medical Center, Amsterdam. Biostatistics	2012	1.1
AMC Graduate School, Academic Medical Center, Amsterdam. Basic Course in Legislation and Organization for Clinical Researchers (BROK)	2012	0.9
Center for Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Haarlem. Organization and participation AIO retreat	2011	1.0
AMC Graduate School, Academic Medical Center, Amsterdam. Laboratory Animals Course	2011	3.9
AMC Graduate School, Academic Medical Center, Amsterdam. Basic Laboratory Safety	2011	0.4
AMC Graduate School, Academic Medical Center, Amsterdam. AMC World of Science	2010	0.7

### **Student Monitoring / teaching**

Dorith Claushuis, Master internship, Medicine, VU university	2014	1.0
Bregje Albersen, Bachelor internship, Biomedical Sciences, VU University	2013	1.0
APROVE and the stichting Wetenschapsoriëntatie Nederland (WON): 'Back to the Future' high school project, Blariacum College, Venlo	2012	1.0

### **Awards**

Best oral award Dutch Society for Thrombosis and Hemostasis (NVTH)	2014	
Award of Excellence, Dutch Society on Thrombosis and Hemostasis (NVTH)	2013	
AMC Graduate School PhD Scholarship	2010	

---



## Dankwoord (samenvatting)

Zonder mijn wetenschappelijke stage in Boston, waarnaar mijn (toen nog niet) schoonvader me begeleidde, zonder het bezielende voorbeeld van Bob Montgomery en Dick Grand, had experimenteel onderzoek mij nooit zo gegrepen.

Professor doctor Tom van der Poll, zeer gerespecteerde promotor, en doctor Cornelis van 't Veer, dynamische co-promotor, jullie zijn een gouden promotieteam voor mij geweest. Een team dat elkaar aanvult en scherp houdt - met genoeg vertrouwen in mij om me mijn eigen weg te laten kiezen. Ik ben ontzettend blij dat ik na anderhalf jaar van aandachtsgebied mocht wisselen naar mijn lievelingscellen, de bloedplaatjes. Ik vind het dan ook geweldig dat dit onderzoek na mij wordt voortgezet en kijk uit naar de resultaten die we dan nog halen. Tom, met bewondering kijk ik hoe het je lukt om de vader van de Tommies, het hoofd van het CEMM, de 'bobo' in de sepsiswereld en hoofd van de Infectieziekten in het AMC te zijn. Ondanks dit was je altijd op de hoogte van mijn onderzoek en wist je de grotere verbanden en de *next step* feilloos uit mijn data te halen. Naast dat wetenschappelijke talent lukt het jou om onze groep altijd uit te breiden met de leukste collega's en de gelegenheden te creëren die maken dat wij zo'n hechte groep zijn.

Kees, onuitputtelijke bron van kennis van alles dat met stolling, labtechnieken en nu ook plaatjes te maken heeft. Van jou heb ik hopelijk geleerd dat ik de juiste controles nu in elk experiment meeneem. En om te zeevissen, te dansen in Kon-tiki of karaoke zingen in Kyoto.

Veel dank aan de (oud) analisten en overige medewerkers van het CEMM en het LEKC. Met name Joost en Marieke, met jullie eindeloze flexibiliteit en geduld waardoor alle proeven uitvoerbaar en gezellig werden. Stollers, dankzij jullie reflectie en feedback bij onze tweewekelijkse besprekingen mag het eindresultaat er volgens mij wezen. Maryse, dank voor de kans van ons mooie humane plaatjes en sepsis stuk en Dorith, fijn dat jij het bent die onze plaatjesquest doorzet!

Mijn waardering gaat ook uit naar de leden van mijn promotiecommissie voor het toetsen van mijn proefschrift.

Een promotietraject is ongelofelijk *leuk*. Lieve Tommies, wat hebben we een plezier gemaakt op het lab, in Japan, Miami, Milaan, Barcelona, Koudekerke, op retraite, bij elkaar thuis en in de disco of de kroeg. Ontzettend veel dank!

Lieve paranimfen, Madelon en Katja, met jullie deel ik vriend- en wetenschap, in die volgorde. Ma, het Boston avontuur en vele avonturen daarna deelde ik met jou. Het is waanzinnig leuk en fijn jou zo dicht in mijn leven en aan mijn zijde te hebben. Kat, wat ben je een bevlogen en inspirerend mens! Heerlijk dat ik je heb leren kennen; ik heb zin in alle avonden vlees, kaas en wijn met jou en Tijmen die nog zullen volgen.

Mijn geweldige vrienden: het onderzoek kon me blij maken, maar ook gefrustreerd en in welke van die twee situaties jullie me ook aantreffen, met jullie erbij is het leven lichter en leuker. Tijdens een onderzoekstraject kan je ook makkelijk op vakantie of een dagje later komen en daar hebben we van genoten!

Lieve papa en mama, wat heeft ons gezin tijdens mijn promotiejaren veel meegemaakt, maar wat ben ik trots dat jullie ons bij elkaar hebben gehouden. Lieve broers Sebas en Allard: grote rotsen in onze branding. Ik ben zo blij dat ik jullie zusje ben.

Jarom, liefste vriend, bij jou begint en eindigt mijn wereld. En ons kleintje, ik kan niet wachten je te zien.

