



UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Built for the kill. Studies on the neutrophil NADPH oxidase

van Bruggen, R.

Publication date
2004

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

van Bruggen, R. (2004). *Built for the kill. Studies on the neutrophil NADPH oxidase.*

General rights

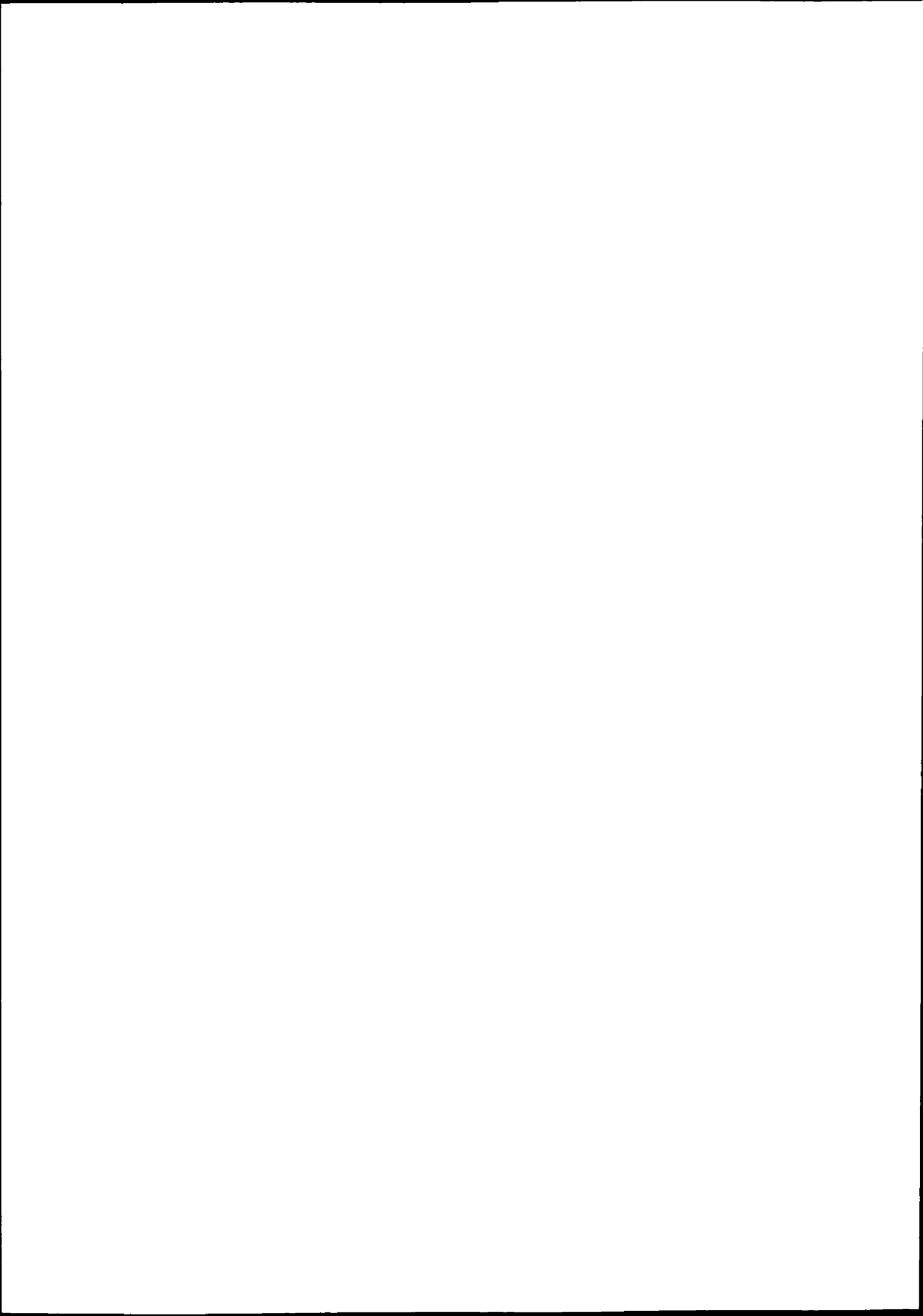
It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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.

Chapter 8

Samenvatting



Samenvatting

Bloed bevat verschillende soorten cellen, elk met hun eigen specifieke taak. De meest voorkomende cellen zijn rode bloedcellen, welke van belang zijn voor het transport van zuurstof van de longen naar de verschillende weefsels. Ook circuleren er bloedplaatjes, die van groot belang zijn voor snelle en efficiënte stolling van het bloed. De laatste, meer diverse, groep bloedcellen wordt gevormd door de witte bloedcellen. Witte bloedcellen maken deel uit van het immuunsysteem en beschermen ons tegen infecties door micro-organismen, zoals bacteriën, virussen en schimmels. De meest voorkomende witte bloedcel is de neutrofiële granulocyt (neutrofiel): 60 tot 70 procent van alle witte bloedcellen zijn neutrofielen. De neutrofiel is een zogenaamde fagocyt, een type cel dat gespecialiseerd is in het opnemen en doden van micro-organismen. Behalve een grote capaciteit om micro-organismen op te nemen en te doden bezit de neutrofiel ook het vermogen om zich in weefsels te verplaatsen, een zeer belangrijke eigenschap voor het efficiënt opruimen van infecties.

In het algemeen verloopt een infectie via een vast scenario. De aanwezigheid van bijvoorbeeld bacteriën in het weefsel leidt tot productie van ontstekingswitten, zoals interleukinen en cytokinen. Deze stoffen zorgen voor veranderingen in nabijgelegen bloedvaten. De endotheelcellen die de vaatwanden van deze bloedvaten bekleden zijn nu in staat om neutrofielen die in de bloedbaan circuleren te binden. De binding (adhesie) van de neutrofielen aan de endotheelcellen leidt tot verdere activering van de neutrofiel waardoor een sterkere binding tussen beide celtypen ontstaat. Vervolgens passeert de neutrofiel de endotheelcellaag door zich tussen twee endotheelcellen door te persen (transmigratie). De neutrofielen bewegen zich dan in de richting van een toenemende concentratie van ontstekingswitten en bacteriële producten naar de plaats van infectie (chemotaxie).

Op de plaats van infectie bevinden zich de bacteriën, die bedekt zijn met antistoffen en met zogenaamde complementfactoren. Een met antistoffen en complement factoren bedekte bacterie wordt herkend via speciale receptoren op het oppervlak van de neutrofiel. Binding van de bacterie aan de neutrofiel via deze receptoren leidt direct tot opname (fagocytose) van de bacteriën door de neutrofiel. Tijdens de fagocytose belandt de bacterie in een door een membraan omgeven structuur, het fagosoom. Dit afgesloten compartiment in de neutrofiel wordt daarna

Chapter 8

gevuld met een groot aantal anti-microbiële enzymen afkomstig uit de korrels (granula) die zich binnenin de neutrofiel bevinden.

Een zeer belangrijk enzym voor het doden van micro-organismen is het NADPH oxidase. Dit enzym zet zuurstof om in superoxide (O_2^-), een reactieve vorm van zuurstof. Superoxide vormt de grondstof voor andere, nog agressievere, zuurstofproducten zoals waterstofperoxide (H_2O_2) en bleekwater ($HOCl$). De productie van superoxide en andere zuurstofproducten vindt plaats in het fagosoom en leidt tot het doden van het gefagocyteerde micro-organisme. De activering van het NADPH oxidase is zeer strikt gereguleerd, daar de reactieve zuurstofproducten ook veel schade aan het lichaam zelf kunnen toebrengen.

Het belang van het NADPH oxidase bij het doden van micro-organismen wordt onderstreept in patiënten die een functioneel NADPH oxidase missen. Deze mensen lijden aan chronische granulomateuze ziekte (CGD), een ziekte die gekenmerkt wordt door herhaaldelijk terugkerende, levensbedreigende infecties door bacteriën en schimmels die voor gezonde mensen geen bedreiging vormen. CGD is een zeldzame, aangeboren afwijking, die ontstaat bij een genetisch defect in een van de vijf genen die coderen voor de essentiële eiwitten van het NADPH oxidase. Ongeveer 1 op 250.000 mensen wordt geboren met een genetisch defect dat leidt tot CGD.

Hoewel de genetica die ten grondslag ligt aan het ontstaan van CGD, zeer goed in kaart is gebracht, bestaan er nog veel hiaten in onze kennis over de exacte structuur en activering van dit belangrijke enzym. Ook de vele mechanismen die micro-organismen gebruiken om zich tegen het NADPH oxidase te beschermen zijn nog lang niet allemaal goed gekarakteriseerd. Kennis hiervan kan een grote stap voorwaarts in het bestrijden van deze micro-organismen betekenen. In dit proefschrift zijn verschillende aspecten van het NADPH oxidase onderzocht, hetgeen heeft bijgedragen aan een beter begrip van het functioneren van dit enzym.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de huidige kennis van zaken aangaande de neutrofiel-gemedieerde afweer tegen micro-organismen. In **Hoofdstuk II** is geprobeerd om de aminozuren die betrokken zijn bij de binding van een essentiële co-factor van het NADPH oxidase, FAD, te identificeren. Eerst werd een moleculair model ontworpen van het gedeelte van het NADPH oxidase waarin zich hoogstwaarschijnlijk de aminozuren bevinden die betrokken zijn bij de binding van FAD. Voor het construeren van dit model werd gebruik gemaakt van de moleculaire structuur van eiwitten die gelijkenis vertonen met het NADPH oxidase. In het model werden vervolgens de aminozuren geïdentificeerd die

betrokken zouden kunnen zijn bij FAD binding. Om te bevestigen dat deze aminozuren inderdaad bij FAD binding betrokken zijn, werden deze aminozuren gemuteerd met een door ons ontwikkelde, nieuwe mutatiemethode. Met deze methode is het mogelijk om in één enkele reactie een vooraf bepaald aminozuur in ieder ander willekeurig aminozuur te veranderen. Na de generatie van een flink aantal mutanten is gepoogd om de binding van FAD aan deze mutanten te meten. Het bleek echter zeer lastig om de binding van FAD aan het NADPH oxidase nauwkeurig te meten, en tot op heden zijn wij er niet in geslaagd om dit technische probleem op te lossen. Er is echter hoop voor de toekomst; binnen de afdeling wordt hard gewerkt aan nieuwe methoden om de structuur van het NADPH oxidase verder te bestuderen. Met behulp van deze nieuwe technieken is het waarschijnlijk mogelijk om FAD binding aan het NADPH oxidase nauwkeurig te meten, wat tot opheldering van de bovengenoemde vraagstukken zal leiden.

Hoofdstuk III beschrijft de ontdekking van een nieuwe mutatie in het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD). Dit enzym katalyseert de omzetting van glucose-6-fosfaat in 6-fosfogluconolacton, een reactie die gepaard gaat met de vorming van NADPH. De omzetting van glucose-6-fosfaat naar 6-fosfogluconolacton door G6PD is een van de reacties die plaatsvinden in de hexose-monofosfaatroute, de enige bron van NADPH in cellen die geen mitochondriën hebben, zoals rode bloedcellen. Mutaties in G6PD leiden tot een verlaging van de hoeveelheid NADPH in cellen zonder mitochondriën, wat ernstige gevolgen kan hebben voor het overleven van de cellen. Over het algemeen komen mutaties in G6PD alleen tot uiting in de rode bloedcellen. De meeste mutaties in G6PD maken het eiwit instabiel, wat resulteert in een snellere afbraak van het eiwit. Aangezien een rode bloedcel een vrij lange levensduur heeft (120 dagen) maar niet in staat is om zelf eiwitten te produceren, verliezen de rode bloedcellen na verloop van tijd G6PD activiteit, zeker als dit enzym instabiel is, en dus de mogelijkheid om NADPH te maken. Dit leidt uiteindelijk tot een versnelde afbraak van de rode bloedcellen en dus tot aanvallen van zeer ernstige bloedarmoede. Granulocyten zijn, net als rode bloedcellen, afhankelijk van G6PD voor de productie van NADPH. NADPH is vooral van belang wanneer superoxide gevormd moet worden door het NADPH oxidase, dus wanneer micro-organismen gefagocyteerd worden. In tegenstelling tot rode bloedcellen, zijn granulocyten zeer kort levende cellen. De meeste mutaties in G6PD leiden dan ook niet tot sterk verminderde G6PD activiteit in de granulocyten, omdat deze cellen ten onder gaan voordat het mutante G6PD volledig is afgebroken. In zeer zeldzame gevallen

Chapter 8

echter is de stabiliteit en/of de activiteit van het G6PD zo laag dat het resulteert in een sterk verlaagde NADPH concentratie in de granulocyten. Mensen met een dergelijke mutatie kunnen naast episodes van zeer ernstige bloedarmoede ook aan CGD-achtige symptomen lijden. In dat geval zijn de granulocyten van deze patiënten niet in staat voldoende superoxide en andere zuurstofproducten te genereren en micro-organismen te bestrijden. Wij vonden in twee patiënten, die niet verwant waren en symptomen van zowel bloedarmoede als CGD vertoonden, een nieuwe mutatie in G6PD. Na biochemische analyse van het bloed van deze patiënten bleek zowel in de rode bloedcellen als in de granulocyten de G6PD activiteit volledig afwezig te zijn. In het gen dat codeert voor G6PD bleken in de DNA sequentie bij beide patiënten drie DNA bouwstenen te ontbreken, waardoor het G6PD eiwit bij deze patiënten één aminozuur mist. Herhaalde pogingen om het G6PD eiwit in rode bloedcellen en granulocyten van deze patiënten aan te tonen mislukten, wat een belangrijke aanwijzing was dat het mutante eiwit zeer instabiel zal zijn. Echter, wanneer we dit mutante G6PD door bacteriën lieten maken, een methode die ontwikkeld is om de effecten van verschillende mutaties in G6PD op eiwitactiviteit en -stabiliteit te bepalen, bleken de stabiliteit en de activiteit van dit mutante G6PD niet zo ernstig aangetast als van tevoren gedacht. De oorzaak van de lage hoeveelheid G6PD in deze patiënten werd vervolgens in een heel andere richting gezocht. Het zogenaamde messenger RNA (mRNA), kopieën van het DNA die nodig zijn voor de aanmaak van eiwit, waarbij het mRNA als voorschrift dient, werd onderzocht op stabiliteit. Een verlaagde hoeveelheid mRNA heeft een lagere hoeveelheid eiwit tot gevolg, wat in een extreem geval het helemaal afwezig zijn van het G6PD eiwit in deze patiënten zou kunnen verklaren. Het mutante G6PD mRNA werd vergeleken met normaal mRNA en bleek inderdaad zeer instabiel, wat hoogstwaarschijnlijk de reden is voor het ontbreken van G6PD in de bloedcellen van deze patiënten.

Voor **Hoofdstuk IV** ontwikkelden wij een techniek waarmee het mogelijk is om met behulp van een microscoop de locatie van individuele eiwitten in levende cellen te volgen in de tijd. Het NADPH oxidase is een eiwitcomplex bestaande uit tenminste vijf eiwitten. Voor twee van deze eiwitten, gp91^{phox} en p22^{phox} genaamd, geldt dat zij zich samen in de celmembraan bevinden. Als duo, cytochroom *b*₅₅₈ genaamd, vormen zij het katalytisch gedeelte van het NADPH oxidase en bevatten onder andere het eerder genoemde FAD en de bindingsplaats voor NADPH. Er zijn drie andere eiwitten die van essentieel belang zijn voor de activering van cytochroom *b*₅₅₈, p47^{phox}, p67^{phox} en Rac2. Deze eiwitten bevinden

zich binnen in de cel en verplaatsen zich bij fagocytose naar de celmembraan waar zij binden aan cytochroom *b₅₅₈*. Op deze manier ontstaat een actief, superoxide producerend NADPH oxidase. Om dit proces van verplaatsing naar de celmembraan, translocatie geheten, in levende cellen onder een microscoop te kunnen bestuderen werden p67^{phox} en Rac2 gekoppeld aan een eiwit dat sterk groen fluoresceert (green fluorescent protein [GFP]). Deze p67-GFP en GFP-Rac2 eiwitten werden vervolgens in granulocyten gebracht en hun locatie in de granulocyten werd tijdens fagocytose van gist bestudeerd. De p67-GFP en GFP-Rac2 eiwitten bleken zich tijdens fagocytose correct naar het membraan van het fagosoom te verplaatsen. Deze eiwitten werden vervolgens gebruikt om vast te stellen of een actief NADPH oxidase een stabiel complex van de verschillende componenten is, of dat er sprake is van een continue opbouw en afbraak van het NADPH oxidase. Een techniek die fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) wordt genoemd is vervolgens uitgevoerd om te bepalen of het NADPH oxidase een stabiel complex is, zoals algemeen aangenomen wordt. Uit de FRAP experimenten bleek echter dat het NADPH oxidase zeer snel opgebouwd en weer afgebroken wordt. Waarschijnlijk wordt het enzym geactiveerd en daarna weer even snel inactief, wat logisch zou zijn omdat op deze wijze de activiteit van dit in principe zeer schadelijke enzym nauwkeurig gereguleerd zou kunnen worden. De GFP-eiwitten werden ook gebruikt om de relatie tussen het cytoskelet, de structuur die van belang is voor de vorm van een cel en alle beweging van die cel, en het NADPH oxidase verder te onderzoeken. Wij vonden dat het cytoskelet alleen van belang is bij de primaire translocatie van p67^{phox} en Rac2 naar het fagosoom. Wanneer de translocatie eenmaal geïnitieerd was, was een intact cytoskelet niet meer van belang.

In de hoofdstukken 5 en 6 bestudeerden wij de rol van het NADPH oxidase bij bestrijding van de *Salmonella* bacterie. *Salmonella* is in staat om zelf granulocyten binnen te dringen, zich in deze cellen schuil te houden en zich in het lichaam te verspreiden. Om binnen in de granulocyt te kunnen overleven, heeft *Salmonella* een aantal strategieën ontwikkeld om activering van het NADPH oxidase te beperken. Wij ontwikkelden een methode om de hoeveelheid waterstofperoxide die het NADPH oxidase produceert in het fagosoom met de *Salmonella* te kunnen meten. Deze methode gebruikten we vervolgens in **Hoofdstuk V** om een mutante *Salmonella* stam te typeren. Deze stam is niet virulent, dat wil zeggen dat muizen die ingespoten worden met deze stam, niet ziek worden. De mutante *Salmonella* wordt in granulocyten gedood, in tegenstelling tot

Chapter 8

normale *Salmonella* bacteriën die hun verblijf in granulocyten overleven. Analyse in onze test voor waterstofperoxide concentratie toonde aan dat er sprake is van een verhoogde hoeveelheid waterstofperoxide in het fagosoom van de mutante *Salmonella* bacteriën. Verdere analyse van de mutante *Salmonella* stam toonde aan dat niet zozeer de hoeveelheid waterstofperoxide die in de nabijheid van deze bacteriën wordt geproduceerd verhoogd is bij deze stam, maar dat deze stam een verhoogde gevoeligheid heeft voor waterstofperoxide. Bovendien bleek het mogelijk om met onze nieuw ontwikkelde test te bewijzen dat ook normale *Salmonella* bacteriën een lage hoeveelheid waterstofperoxide in het fagosoom te verduren krijgen. Dit gegeven werd verder onderzocht in **Hoofdstuk VI**, waar de invloed van Toll-like receptoren (TLRs), op de activering van het NADPH oxidase tijdens *Salmonella* infectie werd bestudeerd. TLRs vormen een familie van receptoren die van belang zijn voor het detecteren van virale en bacteriële producten en bij herkenning van deze producten processen initiëren die van belang zijn voor een goede immuunrespons. Door middel van mutante *Salmonella* bacteriën die niet door TLRs herkend worden konden wij aantonen dat activering van het NADPH oxidase tijdens *Salmonella* infectie grotendeels door deze klasse van receptoren geschiedt. Verdere analyse bracht het inzicht dat de *Salmonella* binnenin de granulocyten wordt herkend. Hoewel al langere tijd bekend is dat deze klasse van receptoren van belang is voor herkenning van *Salmonella*, is dit het eerste bewijs dat deze receptoren ook binnenin de cel functioneren en in staat zijn om signalen te geven die leiden tot activering van antimicrobiële enzymen zoals het NADPH oxidase. In **Hoofdstuk VII** worden de resultaten van deze studie geplaatst in het licht van de nieuwe inzichten in dit vakgebied en worden een paar intrigerende vragen bediscussieerd.



