

# Host defense to bacterial endotoxin : role of CD14, LBP and BPI

## Citation for published version (APA):

Dentener, M. A. (1996). *Host defense to bacterial endotoxin : role of CD14, LBP and BPI*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1996

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

### DE AFWEER TEGEN BACTERIËLE ENDOTOXINE: DE ROL HIERIN VAN CD14, LBP EN BPI

Infectie met ziekteverwekkende bacteriën, of de verplaatsing van bacteriën, zoals *Escherichia coli*, vanuit de darmholte het lichaam in, kan schadelijke gevolgen hebben voor de mens. Deze bacteriën dringen in weefsels binnen waar ze zich kunnen vermenigvuldigen, terwijl ze daarnaast giftige stoffen (toxinen) produceren.

De mens bezit een uitgebreid afweersysteem tegen bacteriën. Een grote groep van bacteriën, namelijk de gram-negatieve bacteriën, wordt door het afweersysteem herkend via een specifiek bestanddeel van de bacterie wand, het endotoxine (beschreven in **hoofdstuk 1**). De naam endotoxine is afgeleid van 'endogeen toxine', oftewel toxine van binnen uit. Endotoxine is opgebouwd uit een vet gedeelte (lipide) en een suiker gedeelte (poly-saccharide) en wordt om die reden ook aangeduid als lipopolysaccharide of LPS. Door de interactie van het afweersysteem met endotoxine wordt een reeks van processen geactiveerd die allen bijdragen aan de bescherming tegen gram-negatieve bacteriën. Het endotoxine is dus een unieke herkenningsstructuur voor het afweersysteem waardoor dit systeem tegen de grote groep van gram-negatieve bacteriën kan reageren. Een aantal facetten van de verschillende onderdelen van het afweer systeem op endotoxine, worden hier kort beschreven.

De aanwezigheid van endotoxine in het bloed leidt tot de activatie van zogeheten complement eiwitten, die samen het complement systeem vormen. Het complement systeem draagt op meerdere manieren bij aan de verdediging tegen bacteriën. De geactiveerde complement eiwitten tasten de membraan van de bacterie aan, hetgeen leidt tot sterfte van de bacterie. Ook activeren complement eiwitten de cellen van de afweer die betrokken zijn bij het opruimen van vreemde deeltjes zoals bacteriën. Daarnaast binden complement eiwitten het endotoxine, en in deze complexe vorm wordt het endotoxine gemakkelijker herkend door de cellen van de afweer, en vervolgens onschadelijk gemaakt.

Een ander systeem dat door endotoxine wordt geactiveerd is het stollings systeem. De interactie van endotoxine met stollingsfactoren in het bloed leidt tot de vorming van een bloedstolsel. Dit draagt bij aan de bescherming tegen bacteriën, omdat de bacteriën die worden gevangen in het bloedstolsel zich niet verder kunnen verspreiden in het lichaam. Een andere reactie van het lichaam op endotoxine is de inductie van koorts, hetgeen wordt veroorzaakt door activatie van de hypothalamus, een zenuwcentrum in de hersenen. De verhoogde lichaamstemperatuur remt de deling van micro-organismen en activeert de verdediging van de gastheer.

Naast de reacties van eiwitten in het bloed spelen ook cellen, en in het bijzonder die van het afweersysteem, een belangrijke rol in de verdediging tegen endotoxine/gram-negatieve bacteriën. Twee belangrijke cellen van de afweer zijn de granulocyt en de monocyt. Granulocyten vormen 60-70% van de cellen die in het bloed circuleren, en zijn gespecialiseerd in het opruimen van vreemde deeltjes/bacteriën. Na specifieke interactie van de bacterie met de celwand (de

celmembraan) van de granulocyt wordt de bacterie door een deel van de wand omstulpt en als een zakje naar binnen gehaald. In de granulocyt zijn verscheidene blaasjes (granules) met toxische eiwitten aanwezig, die versmelten met het blaasje waarin de opgenomen bacterie zit en deze onschadelijk maken.

De monocyt vormt ongeveer 5% van de totale hoeveelheid circulerende cellen in de bloedbaan, en kan net als de granulocyt, bacteriën opnemen en onschadelijk maken. Daarnaast zijn monocyten in staat om na prikkeling door endotoxine, hormoon-achtige stoffen, de zogenaamde cytokinen te produceren en af te geven. Cytokinen zijn boodschapper moleculen met vele functies waaronder het activeren van andere cellen van de afweer en het aantrekken van deze cellen naar de plaats van de ontsteking. Ten gevolge van deze activiteiten ontstaat een versterkte afweer.

De gastheer heeft dus een aantal mogelijkheden om te reageren op, en zich te verdedigen tegen, endotoxines en dus tegen gram-negatieve bacteriën. Echter, het is belangrijk dat de activiteiten van deze verdedigingsmechanismen goed gereguleerd worden. Immers een té sterke activiteit, die voor kan komen indien er zeer grote hoeveelheden bacteriën aanwezig zijn, of indien er een overgevoeligheid voor endotoxine bestaat, zoals beschreven bij astma patiënten, is schadelijk is voor de gastheer. Bijvoorbeeld, een niet goed gecontroleerde stolling kan ertoe leiden dat vaten dicht komen te zitten, terwijl het vrijkomen van eiwitten die bacteriën kapot knippen ook schadelijk kan zijn voor het eigen weefsel. Veel van de schadelijke effecten die optreden ten gevolge van een infectie met bacteriën blijken dan ook te worden veroorzaakt door de reactie van de gastheer op het endotoxine van gram-negatieve bacteriën.

In dit proefschrift staan een aantal onderzoeken beschreven die verricht zijn om meer inzicht te verkrijgen in de reacties van de gastheer op endotoxine. Dit inzicht draagt bij aan het ontwikkelen van therapieën waarmee overmatige reacties op, en dus schadelijke effecten van endotoxine voorkómen kunnen worden.

De gevoeligheid voor endotoxine van mens en verschillende diersoorten is niet gelijk. De mens reageert b.v. al op veel kleinere hoeveelheden endotoxine dan de muis en de rat, terwijl het konijn ook erg gevoelig is voor endotoxine. De gevoeligheid voor endotoxine kan onder bepaalde omstandigheden veranderen. Na blootstelling aan lood worden muizen veel gevoeliger voor endotoxine. In **hoofdstuk 2** hebben we onderzoek gedaan naar het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt. Een belangrijk cytokine dat gevormd wordt door endotoxine geactiveerde monocyten is het TNF (Tumor Necrosis Factor). TNF speelt een essentiële rol in de ontstekingsreacties die veroorzaakt worden door bacteriën en endotoxine, terwijl grote hoeveelheden TNF toxisch zijn. Wij toonden aan dat het TNF belangrijk is in de verhoging van de gevoeligheid van muizen voor endotoxine na blootstelling aan lood. Ten eerste bleek dat lood óók de gevoeligheid van muizen voor TNF verhoogde. Ten tweede, na de blokkade van de biologische activiteiten van TNF was de sterfte ten gevolge van blootstelling aan lood en endotoxine sterk verminderd. Het cytokine TNF dat wordt geproduceerd na blootstelling aan endotoxine is dus bepalend voor de mate van gevoeligheid voor endotoxine.

Vervolgens zijn studies uitgevoerd om na te gaan op welke manier het endotoxine de verschillende cellen van het afweer systeem activeert. Om op endotoxine te kunnen reageren moet er een specifieke herkenning van endotoxine met de cellen plaatsvinden. Deze interactie verloopt via bepaalde eiwitten gelokaliseerd op de membraan van de cellen, die het endotoxine herkennen en vervolgens een signaal de cel in sturen, hetgeen leidt tot celactivatie. Deze ontvanger-eiwitten worden ook receptoren genoemd.

Een membraaneiwit op monocyten waarvan bekend is dat het als receptor voor endotoxine functioneert is het CD14 eiwit. CD14 bindt endotoxine en geeft signalen door die resulteren in de productie van het cytokine TNF. Echter, in respons op endotoxine wordt door monocyten behalve TNF ook de cytokinen IL-6 en IL-8 geproduceerd. De studie beschreven in **hoofdstuk 3** laat zien dat het CD14 eiwit eveneens betrokken is bij de door endotoxine veroorzaakte productie van IL-6 en IL-8. Dit werd aangetoond in monocyten van het bloed, en in alveolaire macrofagen, een monocyt-achtige cel die in de longen aanwezig is.

Endotheelcellen vormen de binnenbekleding van de bloedvaten. Deze cellen zijn ook in staat om op endotoxine te reageren. Het resultaat hiervan is ondermeer dat cellen van de afweer makkelijker naar het gebied van de infectie kunnen migreren. Aangezien het onbekend was via welk membraaneiwit de endotheel-cellen het endotoxine specifiek herkennen, hebben we onderzocht of CD14 hier eveneens een rol in speelt. In de studie beschreven in **hoofdstuk 4** toonden we aan dat in de aanwezigheid van antistoffen (Y-vormige bloedeiwitten die zeer specifiek een bepaald eiwit binden) die de biologische activiteit van CD14 blokkeerden, de endotheelcel activatie door endotoxine geremd was. Dit suggereert zeer sterk dat het CD14 eiwit betrokken is bij de endotheelcel activatie door endotoxine. Echter, omdat het niet lukte om het CD14 eiwit aan te tonen op de membraan van de endotheelcellen, was het onduidelijk op welke manier dit proces plaats vond. Verdere studies van andere onderzoeksgroepen hebben aangetoond dat het CD14 niet alleen voorkomt als membraan-gebonden eiwit, maar ook in een losse vorm, het soluble CD14 (sCD14), circulerend in het bloed. Het sCD14 bindt endotoxine en dit complex gaat een interactie aan met een onbekend eiwit op endotheelcellen, hetgeen resulteert in endotheelcel activatie.

TNF is in staat om andere cellen te activeren, hetgeen leidt tot een ontstekingsreactie. TNF interacteert met cellen via 2 specifieke membraaneiwitten, de TNF receptoren genaamd TNF receptor 1 (TNFR1) en TNFR2. Na activatie van cellen kunnen deze TNF-receptoren van de membraan afgesplitst worden, waardoor losse oftewel soluble TNF-receptoren (sTNFR) ontstaan. Deze sTNFR kunnen TNF binden, en op deze wijze de activatie van cellen door TNF beïnvloeden. In **hoofdstuk 5** tonen we aan dat na de blootstelling aan endotoxine monocyten TNFR2 afsplitsen, volgens een proces dat plaats vindt via het membraan gebonden CD14 eiwit.

Eerdere studies hebben aangetoond dat in het lichaam verschillende eiwitten aanwezig zijn die de effecten van endotoxine kunnen beïnvloeden. Een van deze eiwitten is het LPS bindende proteïne (LBP), welke in het bloed circuleert en

endotoxine bindt. Het complex van endotoxine en LBP kan veel gemakkelijker aan het membraan CD14 binden dan het losse endotoxine. Dit betekent dat in de aanwezigheid van LBP veel minder endotoxine nodig is voor binding aan membraan CD14, en dus voor cel activatie. In de studie beschreven in hoofdstuk 5 is verder aangetoond dat in de aanwezigheid van LBP veel minder endotoxine nodig was om het afsplitsen van de TNFR2 te induceren.

Een ander eiwit dat endotoxine bindt is het BPI (bactericidal/permeability-increasing protein), een eiwit aanwezig in de granule van de granulocyt. Van dit eiwit is bekend dat het de effecten van endotoxine kan remmen. In overeenstemming hiermee zagen wij dat het BPI de endotoxine geïnduceerde afsplitsing van de TNF receptor sterk verminderde.

De lichaamseigen, endotoxine bindende eiwitten LBP en BPI oefenen dus een tegengesteld effect uit met betrekking tot de endotoxine geïnduceerde monocyt activatie. LBP vergemakkelijkt de binding van endotoxine aan CD14 waardoor de monocyt bij een lagere endotoxine hoeveelheid geactiveerd wordt en de cel dus gevoeliger is voor endotoxine. Het BPI daarentegen remt de activatie van monocyt door endotoxine en maakt de cel ongevoeliger voor endotoxine. Bovendien is bekend dat de structuur van LBP en BPI veel overeenkomsten vertonen. In **hoofdstuk 6** is de werking van beide eiwitten nader bekeken. We toonden aan dat LBP en BPI elkaars functie remmen. Indien een hoge LBP concentratie aanwezig was kon BPI de endotoxine geïnduceerde cytokine productie door monocyt niet meer remmen, terwijl bij een hoge BPI concentratie LBP geen effect meer had op endotoxine. Deze tegenwerking bleek veroorzaakt te worden doordat LBP en BPI met elkaar concureren voor binding aan het endotoxine. Deze resultaten betekenen dat de verhouding tussen de hoeveelheid LBP en BPI bepaalt in welke mate endotoxine monocyt kan activeren.

Van het BPI eiwit was oorspronkelijk bekend dat het een bacterie dodend eiwit is. Aangezien BPI bovendien de biologische activiteiten van endotoxine kan remmen, zijn meerdere studies verricht naar dit granulocyt eiwit. Hiertoe zijn twee antistoffen, die specifiek het BPI herkennen, ontwikkeld en gekarakteriseerd, als beschreven in **hoofdstuk 7**. Met deze antistoffen werd de aanwezigheid van BPI in de granule van de granulocyt aangetoond, terwijl BPI ook aanwezig bleek te zijn op de celmembraan van de granulocyt. Daarnaast waren beide antistoffen in staat de biologische activiteit van BPI te remmen.

Gebruik makend van deze anti-BPI antistoffen hebben we laten zien dat BPI niet alleen aanwezig is in de granulocyt, maar óók op de celmembraan van monocyt, **hoofdstuk 8**. Het BPI op de monocyt membraan was in staat om endotoxine te binden. Aangezien er geen aanwijzingen waren dat de monocyt zelf BPI produceren vermoeden we dat het BPI door de monocyt wordt opgenomen uit hun omgeving.

Vervolgens is nagegaan onder welke condities de granulocyt het BPI vrijmaken uit de granule in de cel en vervolgens afgeven in de omgeving. Hiertoe werd bloed (met

de daarin aanwezige granulocyten) gestimuleerd met een aantal bestanddelen afkomstig van verschillende micro-organismen waaronder gram-negatieve bacteriën, alsook met cytokinen, **hoofdstuk 9**. Het bleek dat met name endotoxine, waartegen BPI specifiek gericht is, en TNF de afgifte van BPI het meest stimuleerden. Echter, de hoeveelheid BPI die uitgescheiden werd was nooit meer dan 20% van de totale hoeveelheid BPI aanwezig in de granulocyt. Dit betekent dat het grootste deel van BPI in de cel blijft. Deze resultaten suggereren dat de belangrijkste taak van BPI is om in de granulocyt de opgenomen bacterie te doden, of het binnengehaalde endotoxine te neutraliseren.

Ook is geanalyseerd of BPI aanwezig is in bloed van gezonde individuen en/of in verschillende lichaamsvloeistoffen van patiënten, **hoofdstuk 10**. In bloed van gezonde personen was geen BPI aantoonbaar, terwijl in bloed van ernstig zieke patiënten, in vocht afkomstig uit wonden, in pleuravocht en in vocht uit de longen van patiënten, wel BPI aanwezig was. Dit duidt erop dat de granulocyten van deze patiënten geactiveerd waren, of kapot waren gegaan, waardoor BPI was vrijgekomen.

Alhoewel het BPI aanwezig is in biologische vloeistoffen van patiënten (hoofdstuk 10), zal het biologisch effect van BPI op endotoxine mede worden bepaald door de aanwezigheid van andere endotoxine bindende eiwitten zoals LBP en sCD14. Daarom zijn de hoeveelheden van deze drie eiwitten gemeten in een groep patiënten met een bacteriële infectie, **hoofdstuk 11**. In het bloed van deze patiënten waren, in vergelijking met gezonde personen, sterk verhoogde concentraties van LBP en BPI aanwezig, terwijl de hoeveelheid sCD14 niet was veranderd. De hoeveelheid LBP was gerelateerd aan het verergeren van het ziektebeeld, namelijk het optreden van een sepsis syndroom. De BPI/granulocyt ratio was ook gecorreleerd met het ontstaan van een sepsis syndroom, alsook met het overlijden van de patiënten. Deze data geven aan dat de hoeveelheden LBP en BPI in het bloed de ernst van de ziekte weerspiegelen.

Concluderend: In dit proefschrift zijn verschillende onderdelen van de gastheer respons op endotoxine geanalyseerd. We hebben aangetoond dat het cytokine TNF een belangrijke rol speelt in de verhoogde gevoeligheid voor endotoxine, die ontstaat na de blootstelling aan lood. Verder is duidelijk geworden dat membraan CD14 betrokken is bij vele effecten die endotoxine uitoefent op monocytten, namelijk de productie van TNF, IL-6 en IL-8, maar ook de afsplitsing van één TNF-receptor (TNFR2). Deze effecten van endotoxine worden versterkt door LBP en geremd door BPI. LBP en BPI blijken elkaars werking op te heffen, doordat ze met elkaar concurreren voor binding op het endotoxine. Daarnaast is aangetoond dat het CD14 eveneens een belangrijke rol speelt in de endotheelcel activatie door het endotoxine.

Verder zijn studies verricht met betrekking tot BPI, een endotoxine neutraliserend granulocyt eiwit. Antistoffen tegen BPI zijn ontwikkeld. Met deze stoffen kon worden aangetoond dat BPI ook op de membraan van monocytten voorkomt. Endotoxine en TNF blijken de meest sterke stimulators te zijn van BPI afgifte door granulocyten. Echter, omdat het grootste deel van BPI intracellulair blijft

concluderen wij dat het de belangrijkste taak van BPI is om in de granulocyt, de opgenomen bacteriën/endotoxine te doden cq te neutraliseren. In het bloed van gezonde personen kon geen BPI aangetoond worden terwijl in vloeistoffen van patiënten wel BPI aanwezig was. De werking van dit extracellulaire BPI hangt af van de aanwezigheid van andere endotoxine bindende eiwitten. De hoeveelheden LBP en BPI aanwezig in het bloed van ernstig zieke patiënten bleken een maat te zijn voor de ernst van de ziekte.