

Beyond communication

Citation for published version (APA):

Volgers, C. (2017). *Beyond communication: membrane vesicle release during macrophage infection by common respiratory pathogens*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20171005cv>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171005cv](https://doi.org/10.26481/dis.20171005cv)

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

The release of membrane vesicles is a process that is conserved amongst cells of all branches of life and the physiological functions and release are highly dynamic and context dependent. In this thesis, we presented studies that addressed the release of host cell and bacterial membrane vesicles in the context of infection with the common respiratory pathogens non-typeable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

In the general introduction (**chapter 1**) the context for this thesis was outlined by describing bacterial infections of the airways by common respiratory pathogens, innate immunity to infection, and intercellular communication by means of membrane vesicles during infection and inflammation.

In **chapter 2**, we reviewed how vesicle shedding is affected by a plethora of host-associated factors. These factors include physiological barriers, antimicrobial peptides released by host tissues, bacterial antimicrobial peptides found within host niches, and antibiotics. Another aspect that is covered in this review is how these vesicles confer bacteria with a means to cope with challenges that bacteria are faced with during invasion and occupation of host niches.

It is important to study the release of membrane vesicles in a physiological situation. This, however, remains challenging as most currently available techniques for characterization and isolation have specific shortcomings. One such shortcoming is that it is difficult to determine the release kinetics of specific membrane vesicle subpopulations in mixed vesicle populations (e.g. composed of host and bacterial vesicles). In **chapter 3** an assay is presented which was developed by us to overcome this problem and which allows the semi-quantitative analysis of specific membrane vesicle subpopulations within such heterogeneous vesicle populations.

In **chapter 4** the release and functional activity of bacterial and host cell membrane vesicles released during macrophage infection with non-typeable *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* were determined. This study revealed that during infection both host cells and bacteria release membrane vesicles. Moreover, we demonstrated that host cell-derived vesicles do not induce a significant pro-inflammatory cytokine release whereas bacterial membrane vesicles do. Conversely, these membrane vesicles were also found to result in host cell desensitisation to secondary immunogenic stimuli and to lead to an increased number of adherent and intracellular bacteria. This implies that bacterial membrane vesicles may on one hand aid in the immunity to infection and on the other contribute to bacterial survival.

The release of membrane vesicles can be triggered by various factors, including therapeutic agents. A sudden release of potent immuno-stimulatory membrane vesicles may form a potential hazard. In **chapter 5** the release of bacterial membrane vesicle in response to conventional therapeutics that are used to treat airway inflammation (the glucocorticosteroids fluticasone propionate and budesonide and the macrolide antibiotic azithromycin),

was studied. Again, this was assessed in the context of infection to account for direct and indirect effects of these components (by affecting host cell behaviour) on bacterial membrane vesicle shedding. We determined that the release of membrane vesicles by none of the bacteria was affected by treatment. Moreover, we found that these therapeutics resulted in a significantly decreased pro-inflammatory response to bacterial vesicles.

As conventional therapeutics fall short in the treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease, there is a great need for novel effective treatment approaches that are free of side effects and can be used over long periods of time. N-acetyl-L-cysteine (NAC) is a frequently used mucolyticum that is administered orally. Alternatively, it can also be applied by nebulization, but it is unknown how this affects bacterial behaviour. In **chapter 6** we established the effect of NAC on the bacterial behaviour. Results showed that NAC treatment not only significantly inhibited the growth of all bacteria, it also strongly induced the release of bacterial membrane vesicles. Alternatively, we also revealed that NAC markedly reduced the pro-inflammatory response to membrane vesicles. Therefore, it seems that this initial discharge of pro-inflammatory vesicles is of little consequence and that the overall treatment outcome is most likely positive. Future studies are required to further establish the effects of NAC on airway infection.

In the final chapter of this thesis, **chapter 7** we discussed the major findings and make suggestions for future research. We started this discussion with the technical challenges that come with studying vesicle release in more complex models based on multiple cell types. Hereafter we discussed the physiological activity of host cell-derived and bacterial membrane vesicles. Finally, we discussed how the release of membrane vesicles is affected by external factors with a focus on the therapeutics tested in this studies.

This thesis provides with background on the release of bacterial membrane vesicle release in the context of a host environment. In our studies we show that bacterial membrane vesicles have immuno-stimulatory and modulatory properties. Moreover it was shown how therapeutics may affect inflammatory responses by modulating the release of and the response to pro-inflammatory membrane vesicles. Overall, this thesis provides with an improved insight on the release and functionality of the membrane vesicle release during infection. The gained insights and methodology can guide direction and provide with a means to follow up on this.

SAMENVATTING

De vrijstelling van membraan blaasjes (vesicles) door cellen is een sterk geconserveerd proces en vindt plaats in alle domeinen van het leven waarbij zowel de functionaliteit als de uitscheiding uiterst dynamisch en context afhankelijk zijn. De verschillende studies opgenomen in dit proefschrift richtten zich op de uitscheiding van membraan vesicles door gastheercellen en bacteriën, in de context van infectie met de veelvoorkomende luchtwegpathogenen non-typeable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* en *Pseudomonas aeruginosa*.

In de algemene introductie (**hoofdstuk 1**) wordt de achtergrond voor dit proefschrift gegeven door in te gaan op bacteriële infecties van de luchtwegen, de aangeboren immuunreactie op infecties en de intercellulaire communicatie door middel van membraan vesicles tijdens infecties en ontstekingen.

In **hoofdstuk 2** (het overzichtsartikel) hebben we uitgebreid beschreven hoe de uitscheiding van membraan vesicles beïnvloedt kan worden door een scala aan verschillende gastheer-geassocieerde factoren. Voorbeelden van deze factoren zijn fysiologische barrières, antimicrobiële peptides die worden uitgescheiden door verschillende weefsels in het lichaam, bacteriële antimicrobiële peptides die kunnen worden aangetroffen op specifieke locaties in het lichaam en bepaalde antibiotica. Een ander aspect dat in dit overzichtsartikel wordt besproken is hoe membraan vesicles bacteriën kunnen assisteren bij het omgaan met bedreigingen die ze tegenkomen tijdens de invasie en kolonisatie van gastheer-geassocieerde niches.

Het is belangrijk om membraan vesicles te bestuderen in een fysiologische situatie. Dit blijkt echter complex te zijn omdat het merendeel van de beschikbare conventionele technieken voor het karakteriseren en isoleren van membraan vesicles bepaalde tekortkomingen hebben. Een van deze beperkingen is dat het moeilijk is om het aandeel van een specifieke membraan vesicle populatie in een samengestelde populatie te bepalen (bijvoorbeeld een populatie die is samengesteld uit gastheer-afkomstige en bacteriële vesicles). In **hoofdstuk 3** presenteren we een door ons ontwikkelde methode. Deze methode stelde ons in staat dit probleem op te lossen door gebruik te maken van met specifieke antilichamen gecoate "beads", waarmee het mogelijk bleek om zowel de membraan vesicles afkomstig van de bacteriën als de gastheer vesicles semi-kwantitatief te bepalen.

In **hoofdstuk 4** hebben we de vrijstelling en functionaliteit van bacteriële en van de gastheercel afkomstige membraan vesicles bepaald tijdens de infectie van macrofagen met de eerder genoemde luchtwegpathogenen. In deze studie konden we aantonen dat de uitscheiding van membraan vesicles tijdens infectie plaats vindt door zowel de gastheercellen als de bacteriën. Voorts hebben we hier aangetoond dat blootstelling van macrofagen aan vesicles afkomstig van gastheercellen niet zorgen voor de uitscheiding van ontstekingsbevorderende cytokinen terwijl dit wel het geval was na blootstelling aan bacteriële vesicles. Anderzijds konden we ook aantonen dat deze bacteriële vesicles kunnen zorgen voor een verminderde ontstekingsreactie op een daaropvolgende immunogene prikkel. Ook zagen we dat de blootstelling aan bacteriële vesicles zorgde voor

een verhoogde bacteriële adhesie en meer intracellulaire bacteriën. Dit suggereert dat de bacteriële membraan vesicles de immunreactie op een infectie kunnen bevorderen maar dat deze ook kunnen bijdragen tot infectie.

De uitscheiding van membraan vesicles kan worden veroorzaakt door verscheidene factoren inclusief therapeutische middelen. Een onverhoedse vrijstelling van sterk ontstekingsbevorderende membraan vesicles als resultaat van een bepaalde therapeutische interventie zou potentieel gevaarlijk kunnen zijn. In **hoofdstuk 5** wordt de uitscheiding van bacteriële membraan vesicles na blootstelling aan conventionele therapeutische middelen (de glucocorticosteroiden fluticasone propionate en budesonide en het macrolide antibioticum azithromycine) nader bepaald. Wederom werd dit uitgezocht in de context van een infectie om zo de directe als ook indirecte effecten (door de beïnvloeding van het gedrag van de gastheercellen) van deze componenten op de vrijstelling van bacteriële membraan vesicles mee te kunnen nemen. We konden vaststellen dat geen van de therapeutische middelen de vrijstelling van membraan vesicles door de bacteriën beïnvloedde. Daarnaast vonden we dat deze middelen leidden tot een aanzienlijk verminderde ontstekingsreactie na blootstelling aan bacteriële vesicles.

Omdat conventionele therapeutische middelen tekortschieten in de behandeling van patiënten met chronische obstructieve luchtwegaandoeningen, zoals COPD en astma, is er een grote behoefte aan nieuwe effectieve behandelingsmethoden die vrij zijn van bijwerkingen en die gedurende langere tijd gebruikt kunnen worden. N-acetyl-L-cysteïne (NAC) is een veelvuldig gebruikt slijmoplossend middel dat over het algemeen oraal wordt toegediend. Optioneel kan het ook worden toegediend door middel van verneveling. Het is echter niet bekend hoe dit middel het gedrag van bacteriën beïnvloedt. In **hoofdstuk 6** hebben we uitgezocht hoe een blootstelling aan NAC het gedrag van bacteriën beïnvloedt. Onze resultaten lieten zien dat blootstelling aan NAC niet alleen leidde tot een aanzienlijke remming van de bacteriële groei, maar daarnaast ook leidde tot een sterk verhoogde uitscheiding van bacteriële membraan vesicles. Echter, we konden ook een sterke verlaging van door membraan vesicles geïnduceerde ontstekingsreactie na blootstelling aan NAC aantonen. Derhalve lijkt het ons waarschijnlijk dat de aanvankelijke vrijstelling van ontstekingsbevorderende vesicles minimale consequenties heeft en dat de uiteindelijke uitkomst van de behandeling vermoedelijk positief is. Vervolgstudies zijn echter nodig om de effecten van NAC op luchtweginfecties nader te bepalen.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**hoofdstuk 7**) zijn de belangrijkste bevindingen besproken en zijn er suggesties gedaan voor toekomstig onderzoek. We zijn in deze discussie begonnen met de technische uitdagingen die zich aandienen bij aanvang van het hier beschreven promotietraject bij het bestuderen van de uitscheiding van membraan vesicles in gecompliceerdere modellen die zijn samengesteld uit meerdere celtypen. Vervolgens is de fysiologische activiteit van vesicles afkomstig van zowel bacteriën als gastheercellen besproken. Tot slot hebben we besproken hoe de uitscheiding van membraan vesicles beïnvloed wordt door externe factoren, waarbij de focus lag op de therapeutische middelen die gebruikt worden bij de behandeling van patiënten met chronische obstructieve luchtwegaandoeningen.

Dit proefschrift geeft achtergrond over de uitscheiding van bacteriële membraan vesicles in een omgeving zoals deze zich voordoet in de gastheer. In dit onderzoek konden we aantonen dat bacteriële membraan vesicles een ontstekingsbevorderend, maar ook een immuun-modulerend effect kunnen hebben. Daarnaast werd aangetoond hoe therapeutische middelen de ontstekingsreactie kunnen beïnvloeden door effect uit te oefenen op de vesicle-uitscheiding en op de ontstekingsreactie van macrofagen na blootstelling aan deze vesicles. Alleszins geeft dit proefschrift een beter inzicht in de uitscheiding en functionaliteit van membraan vesicles zoals die worden vrijgesteld tijdens infectie. De verkregen inzichten kunnen helpen bij het bepalen van een toekomstige koers voor vervolgstudies en de ontwikkelde methodologieën kunnen hierbij van toegevoegde waarde zijn bij de uitvoering van deze toekomstige studies.