

An in vitro and in vivo study towards the effect of *Chlamydia pneumoniae* infection on brain cells

Citation for published version (APA):

Boelen, E. (2007). *An in vitro and in vivo study towards the effect of Chlamydia pneumoniae infection on brain cells*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070705eb>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070705eb](https://doi.org/10.26481/dis.20070705eb)

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.

Samenvatting

Door de vergrijzing in onze westerse maatschappij vormen neurodegeneratieve stoornissen bij ouderen, zoals de ziekte van Alzheimer, een toenemend gezondheidsprobleem dat gepaard gaat met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Daarom is het belangrijk dat we onze kennis met betrekking tot risicofactoren en onderliggende mechanismen van deze ziekte uitbreiden. Hoewel verschillende risicofactoren reeds geïdentificeerd zijn, is er nog steeds geen duidelijke oorzaak voor deze aandoeningen bekend. Wel worden ontstekingen, waarvan reeds bekend is dat ze bijdragen aan het voortschrijden van neurodegeneratieve aandoeningen, meer en meer genoemd als mogelijke oorzaak. Verder is er geopperd dat diverse virussen, zoals het humaan immunodeficiëntie virus (HIV), het herpes simplex virus of het cytomegalovirus, deze ontstekingen kunnen veroorzaken of stimuleren en als zodanig kunnen bijdragen aan het neurodegeneratieve proces. Daarnaast zijn er recent ook onderzoeksresultaten gepubliceerd die suggereren dat de respiratoire, obligaat intracellulaire bacterie *Chlamydia pneumoniae* (Cpn), waarvan bekend is dat ze chronisch inflammatoire aandoeningen kan veroorzaken, ook een rol zou kunnen spelen bij de ontwikkeling van verschillende neurodegeneratieve stoornissen. Zo kon, in een studie uit Amerika in 1998, Cpn duidelijk aangetoond worden in de hersenen van Alzheimer patiënten terwijl deze bacterie vrijwel afwezig was in de hersenen van personen zonder Alzheimer. Deze bevindingen vormden de aanleiding voor de hypothese dat Cpn een rol speelt in het ontstaan van deze ziekte. Om deze hypothese nader te onderzoeken werden er verschillende *in vitro* en *in vivo* studies uitgevoerd ten einde een beter inzicht te krijgen of, en op welke wijze, *Chlamydia pneumoniae* kan bijdragen aan deze ernstige ziekte.

***In vitro* studies**

In het eerste onderzoek werd met behulp van celweek onderzocht of Cpn in staat is om neurodegeneratie te veroorzaken en of dit gemanifesteerd werd door directe infectie van neuronale cellen of door chronische cerebrale inflammatie, die veroorzaakt werd door de infectie.

Hoewel reeds bekend was dat Cpn verschillende celtypes kan infecteren, was het bij de start van de experimenten, die beschreven zijn in dit proefschrift, onduidelijk of hersencellen ook toegankelijk zijn voor deze bacterie. Daarom werd dit eerst *in vitro* onderzocht met behulp van verschillende hersencellijnen: microglia (MMC), neuronen (NB) en astrocyten (C8D1A). Een humane epitheelcellijn (Hep2) werd als referentie meegenomen (**Hoofdstuk 2**). Verder werd er bepaald of Cpn infectie rechtstreeks celdood kan veroorzaken, en zo ja, of dit gebeurt via apoptose of necrose. Immunohistochemische kleuringen van onze referentieceldlijn (Hep2) toonden aan dat de ontwikkelingscyclus van Cpn volledig werd gevolgd. Op vroege tijdstippen na infectie werden kleine inclusielichaampjes gedetecteerd. Vervolgens was er vanaf 24 uur na infectie een duidelijke toename in grootte van deze inclusielichaampjes waarneembaar, met maximale afmetingen op 48 en 72 uur na infectie. Hoewel Cpn op deze tijdstippen niet meer in alle cellen gedetecteerd kon worden, bleek het merendeel toch geïnfecteerd te zijn. Inclusielichamen van verschillende afmetingen konden tenslotte worden aangetoond op zowel 1 als 2 weken na infectie. Identieke infectiepatronen werden aangetoond in onze neuronale cellijn, waarmee we konden aantonen dat deze cellen gemakkelijk door

Cpn geïnfecteerd kunnen worden. Verder kon de productie van infectieuze partikels aangetoond worden en bleken de neuronen na Cpn infectie af te sterven door necrose. Een vergelijkbaar infectieverloop konden we aantonen in astrocyten, waarbij aangetekend dient te worden dat in deze cellen een lagere productie van infectieuze partikels werd gevonden.

Daarentegen waren de resultaten van de microgliacellen (de hersenequivalent van macrofagen in de rest van het lichaam) opvallend verschillend van de resultaten in de neuronen en de astrocyten. Er konden met behulp van immunohistochemische kleuringen vrijwel geen Cpn-positieve cellen worden aangetoond op late tijdstippen na infectie, wat suggereerde dat microgliacellen weinig permissief zijn voor Cpn. Bovendien konden er nauwelijks extracellulaire infectieuze Cpn partikels worden aangetoond en werd er geen Cpn-gerelateerde celdood gevonden. Niettemin werden significante hoeveelheden Cpn DNA gedetecteerd, waaruit geconcludeerd kan worden dat microgliacellen in staat zijn om de Cpn infectie onder controle te houden. Een interessant gegeven is dat monocytten, de equivalent van de microgliacellen in de rest van het lichaam, tot een soortgelijke controle van Cpn infectie in staat zijn. Verder heeft deze bevinding geleid tot de hypothese dat de microgliacellen een functionele en eventueel anatomische filter vormen (op basis van het feit dat microgliacellen onmiddellijk migreren naar de plaats van infectie) om meer gevoelige celtypes (neuronen) te beschermen tegen infecties.

Zoals reeds vermeld, suggereerden onze resultaten dat microgliacellen in staat zijn om een Cpn infectie onder controle te houden. Nu hebben eerdere studies in macrofagen reeds aangetoond dat interferon(INF)- γ en stikstofmonoxide (NO) grotendeels verantwoordelijk zijn voor het controleren van een Cpn infectie. Op basis van deze gegevens werd besloten om te onderzoeken of vergelijkbare mechanismen verantwoordelijk zijn voor het controleren van de Cpn infectie door onze microgliacellijn **(Hoofdstuk 4)**. Echter, noch het remmen van de NO productie, noch het neutraliseren van INF- γ resulteerde in een hogere gevoeligheid van de microgliacellen voor Cpn. Dat INF- γ inderdaad geen significante rol speelt bij het controleren van de infectie werd nog eens onderstreept door het feit dat dit cytokine op geen enkel tijdstip aangetoond kon worden in het medium van geïnfecteerde microgliacellen. Daarentegen werden interleukine(IL)-6 en tumor necrose factor(TNF)- α wel in grote hoeveelheden geproduceerd door de microgliacellen na infectie. Echter, ook het neutraliseren van deze cytokines had geen effect op de gevoeligheid van microgliacellen voor Cpn. Deze resultaten suggereren dus dat geen van deze mediators (INF- γ , TNF- α , IL-6 en NO) een rol speelt in het controleren van een Cpn infectie.

Naast de rechtstreekse gevolgen van Cpn op neurodegeneratie werd ook de hypothese onderzocht dat gliacellen tijdens een Cpn infectie grote hoeveelheden pro-inflammatoire cytokines produceren, wat uiteindelijk kan leiden tot neuroinflammatie en neurotoxiciteit. *In vivo* is dit mechanisme waarschijnlijk zelfs meer voor de hand liggend, aangezien neuronen *in vivo* morfologisch beschermd worden door gliacellen en neuronale celdood als gevolg van een directe infectie van neuronen door Cpn minder voor de hand ligt. Immers, als een micro-organisme de hersenen binnendringt, zal het eerst in contact komen met astrocyten, de belangrijkste component van de bloed-hersen barrière. Dit celttype kan ook in grote getale teruggevonden worden rondom neuronen. Bovendien zullen

microgliacellen, die beschouwd kunnen worden als de immuuncellen van het centrale zenuwstelsel, bij infectie onmiddellijk reageren en migreren naar de plek van gevaar, om zo neuronen te beschermen. Om dit indirecte mechanisme van neuronale celdood als gevolg van de excessieve productie van pro-inflammatoire mediators door geïnfecteerde gliacellen te onderzoeken, werden verschillende cyto- en chemokines gemeten in het medium van Cpn-geïnfecteerde microgliacellen en astrocyten op verschillende tijdstippen na infectie (**Hoofdstuk 3**). Significant hogere hoeveelheden monocytenchemoattractant proteïne (MCP)-1, IL-6, TNF- α en IL-1 β werden gemeten in het medium van geïnfecteerde MMC, in vergelijking met de controles. Bij astrocyten, daarentegen, konden alleen MCP-1 en IL-6 gedetecteerd worden en dit voornamelijk 1 week na Cpn infectie. Verdere ondersteuning voor dit indirecte mechanisme kwam uit de observatie dat blootstelling van neuronen aan geconditioneerd medium van Cpn geïnfecteerde microgliacellen resulteerde in een significante hogere neuronale celdood in vergelijking met blootstelling aan medium van mock geïnfecteerde microgliacellen. Dit werd vooral veroorzaakt door IL-6 en TNF- α , zoals aangetoond in neutralisatie-experimenten. In ons onderzoek hebben wij aangetoond dat Cpn in staat is om met name microgliacellen aan te zetten tot de productie van deze potentieel neurotoxische stoffen. Deze bevinding vormt een verdere onderbouwing van de hypothese dat Cpn kan bijdragen aan het ontstaan van wel het voortschrijden van de neurodegeneratieve processen zoals bij de ziekte van Alzheimer.

Vervolgens werd er onderzocht of deze ontstekingsfactoren ook de glutamaat opname door astrocyten kunnen beïnvloeden. Dit zou kunnen leiden tot neurotoxische concentraties van deze neurotransmitter, zoals het geval is bij onder andere de ziekte van Alzheimer. Inderdaad vonden we een significante stijging in neuronale celdood na behandeling van neuronen met glutamaat bevattend medium van astrocyten, welke eerder blootgesteld waren aan het supernatant van Cpn-geïnfecteerde microgliacellen (**Hoofdstuk 4**). Deze bevindingen suggereerden dat de opname van glutamaat door astrocyten verstoord is na incubatie met ontstekingsfactoren, geproduceerd door Cpn-geïnfecteerde microgliacellen. Echter, nader onderzoek wees uit dat behandeling van astrocyten met ontstekingsmediators-bevattend medium geen verstoring van glutamaat opname tot gevolg had. Ook werden er geen veranderingen gevonden in de aanwezigheid van de belangrijkste glutamaat transporter in astrocyten, glutamaat transporter subtype (GLT)-1 (EAAT2). Op basis van deze resultaten moest geconcludeerd worden dat de gedetecteerde neuronale celdood waarschijnlijk niet veroorzaakt werd door neurotoxische hoeveelheden glutamaat. Dit doet vermoeden dat de blootstelling aan glutamaat er voor zorgt dat met ontstekingsfactoren voorbehandelde astrocyten een, voorlopig onbekende, factor gaan produceren die toxisch blijkt te zijn voor neuronen. Verdere experimenten zijn nodig om te onderzoeken welke stoffen geproduceerd worden door behandelde astrocyten na toevoeging van glutamaat.

Een geïntegreerd model

Op basis van deze data kan een hypothese geformuleerd worden over de mechanismen die Cpn gebruikt om het proces van neurodegeneratie te beïnvloeden.

Ten eerste, omdat men veronderstelt dat Cpn overgedragen wordt via de respiratoire route, zal de primaire plaats van infectie het luchtwegstelsel zijn. Via deze intranasale route zou echter een bepaalde hoeveelheid Cpn rechtstreeks de hersenen kunnen bereiken waardoor Cpn in staat zou zijn om direct in contact te komen met neuronen en deze te infecteren. We toonden aan dat dit celtype zeer gevoelig is voor Cpn en dat neuronen afsterven na infectie waarbij nieuw gevormde infectieuze Cpn lichaampjes vrijkomen. Deze elementaire lichaampjes kunnen vervolgens nabijgelegen cellen, zoals astrocyten, microgliacellen of andere neuronen infecteren. Infectie van astrocyten, de cellen die neuronen het meest omringen, resulteert in een gelijkaardig infectiepatroon, namelijk een hoge infectiegraad en de productie van elementaire Cpn lichaampjes die verder migreren naar aangrenzende cellen. Microgliacellen bleken eerder resistent voor Cpn infectie maar produceerden daarentegen verschillende inflammatoire stoffen, resulterend in neuronale celdood.

Naast deze intranasale route zou Cpn ook de hersenen kunnen binnendringen via andere wegen. Het is algemeen aanvaard dat Cpn voornamelijk via geïnfekteerde monocyt doorheen het lichaam migreert. Tegenwoordig zijn er verschillende routes beschreven over hoe een systemische infectie of inflammatie kan “communiceren” met het centrale zenuwstelsel. Het eerste belangrijke circuit impliceert de circumventriculaire organen, gekenmerkt door de afwezigheid van een bloed-hersen barrière. Op deze plaatsen, waar een direct contact mogelijk is tussen het micro-organisme en neuronen, zou neurodegeneratie kunnen optreden. Echter, de belangrijkste route van een micro-organisme om de hersenen te bereiken is via de bloed-hersen barrière.

Ook Cpn kan via deze barrière, waarvan de permeabiliteit stijgt na Cpn infectie, de hersenen binnendringen. Het micro-organisme zal op deze manier eerst microgliacellen en astrocyten bereiken. In onze studie werd aangetoond dat astrocyten zeer gevoelig zijn voor Cpn en in staat zijn om infectieuze Cpn deeltjes te produceren, waardoor nabij gelegen cellen geïnfecteerd kunnen worden. Daarnaast zal de productie van inflammatoire stoffen door Cpn geïnfekteerde microgliacellen een neurotoxisch milieu creëren waardoor er verder wordt bijgedragen aan het proces van neurodegeneratie. Additioneel zouden pathogenen via andere mechanismen, zoals het beïnvloeden van het glutamaat metabolisme, een effect kunnen hebben op neurodegeneratieve ziekten. Concluderend kan gesteld worden dat pathogenen, zoals Cpn, via verschillende mechanismen neurodegeneratieve processen kunnen beïnvloeden en dat dit kan plaatsvinden zonder direct contact tussen het micro-organisme en de neuronen.

***In vivo* experimenten**

Naast de *in vitro* modellen, werden de gevolgen van een Cpn infectie op de hersenen ook in een muismodel onderzocht. Het belangrijkste doel van ons onderzoek was om te bepalen of een Cpn infectie de extracellulaire aggregatie van amyloïd beta (A β), een van de belangrijkste kenmerken van de ziekte van Alzheimer, kan initiëren in normale muizen. Voor dit onderzoek werden vrouwelijke muizen intranasaal geïnfecteerd met Cpn. Vervolgens werden de hersenen op verschillende tijdstippen na infectie enerzijds gecontroleerd op de aanwezigheid van Cpn en anderzijds op amyloïd plaques. Alhoewel Cpn alleen op 1 week na infectie in de hersenen gedetecteerd kon worden, werden

extracellulaire amyloïd afzettingen aangetoond op zowel 1 en 3 maanden na infectie. Een vergelijkbaar resultaat werd echter ook gevonden in de mock geïnfecteerde muizen. Dit alles doet vermoeden dat de gevonden amyloïd afzettingen niet gerelateerd kunnen worden aan Cpn infectie. Ook werden er opvallende verschillen gevonden in de morfologie van de extracellulaire A β afzettingen in vergelijking met de afzettingen die gevonden worden in een transgeen muismodel voor de ziekte van Alzheimer. Zo werden er bijvoorbeeld geen stervormige aggregaten van A β met een thioflavine-S-positieve en dichte kern gedetecteerd, weefselbeschadiging in de A β positieve gebieden was afwezig en astrocyten werden niet in grote getale in de nabije buurt van A β gevonden. Hoewel niet kan worden uitgesloten dat de morfologische kenmerken die wij observeerden duiden op de initiële stadia van de ziekte, suggereren deze resultaten in elk geval dat één enkele Cpn infectie niet zal leiden tot de vorming van gevorderde A β plaques.

Conclusie

Uit onze *in vivo* modellen kunnen we niet concluderen dat een Cpn infectie de ziekte van Alzheimer veroorzaakt. Echter, op basis van onze *in vitro* data en recente aanwijzingen in de literatuur, kan gesuggereerd worden dat infecties, en Cpn in het bijzonder, kunnen bijdragen aan de progressie van de ziekte van Alzheimer. Dit zou bereikt kunnen worden via een directe weg waardoor neurodegeneratie optreedt ten gevolge van Cpn infectie of eerder indirect via een chronische cerebrale ontsteking met als gevolg de productie van inflammatoire stoffen, resulterend in neurodegeneratie. Hoewel er een toenemende aandacht is voor de rol van infecties in het ontstaan en de voortgang van neurodegeneratieve ziekten, is nog veel onderzoek noodzakelijk en dit zowel op basaal/experimenteel als op klinisch niveau, om de rol van infecties op deze aandoeningen verder te ontrafelen.