



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Salmonella typhimurium and its host : host-pathogen cross-talk, immune evasion, and persistence

Diepen, A. van

Citation

Diepen, A. van. (2005, November 2). *Salmonella typhimurium and its host : host-pathogen cross-talk, immune evasion, and persistence*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4339>

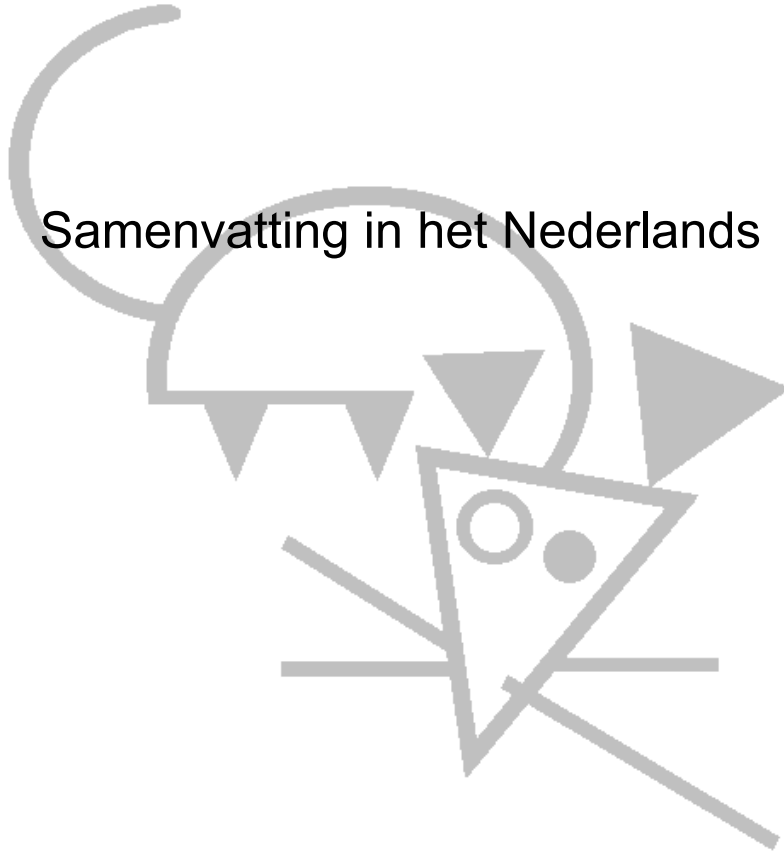
Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4339>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting in het Nederlands



Samenvatting in het Nederlands

Salmonella is een staafvormige bacterie die overal in de natuur voorkomt. De meeste *Salmonella*'s kunnen geen ziekte veroorzaken doordat ze niet overleven in dieren of mensen. Deze komen alleen in de natuur of in het riool voor en zijn ongevaarlijk. Er zijn er echter een aantal die wel kunnen overleven en dit zijn de soorten die verantwoordelijk zijn voor ziekte in mens en dier. *Salmonella* infecties zijn een van de meest voorkomende voedsel-gerelateerde infecties in de wereld en vormen een groot probleem voor mensen in ontwikkelingslanden en voor mensen met een niet goed functionerend immuunsysteem. Ziektebeelden kunnen variëren van asymptomatisch dragerschap waarbij de bacteriën in de darm blijven en via de ontlasting uitgescheiden worden, tot levensbedreigende sepsis waarbij de bacteriën in het bloed terecht komen. Het ziektebeeld is afhankelijk van de *Salmonella* stam waarmee iemand besmet raakt en betreft meestal besmettingen met *S. enterica* serovar Enterica of serovar Typhimurium via met dierlijk afval besmet voedsel of water.

Besmetting met *Salmonella* gebeurt via het eten of drinken van besmet voedsel of water. Het maagzuur zorgt ervoor dat een groot deel van de bacteriën gedood wordt. Echter, wanneer de zuurgraad iets hoger is dan normaal, dan krijgt een deel van de bacteriën de kans om de maag te passeren en in de darm terecht te komen. Daar komen de bacteriën verscheidene andere afweermechanismen tegen zoals een dikke slijmlaag en de natuurlijke darmflora waarmee *Salmonella* een competitie om voedsel moet aangaan. Als *Salmonella* dit redt, zal het uiteindelijk in de dunne darm de Peyerse platen bereiken waarin zich de M cellen bevinden. *Salmonella* invadeert deze M cellen en afhankelijk van de *Salmonella* stam, kunnen twee ziektebeelden optreden. Bij infectie met de typhoïde stammen *S. enterica* serovar Typhi of serovar Paratyphi, stammen die alleen infectie in mensen veroorzaken, zullen de bacteriën zich verspreiden naar de onderliggende lymfoïde weefsels en zullen ze macrofagen binnen treden. De bacteriën komen in het bloed terecht, bereiken de lever en de milt en veroorzaken een ernstige ontstekingsreactie (inflammatoire respons) die typhoïde koorts of buiktyfus genoemd wordt en in 10% van de gevallen dodelijk is wanneer de patient niet behandeld wordt. Wanneer het echter een infectie met de niet-typhoïde stammen betreft zoals *S. enterica* serovar Typhimurium, dan blijven de bacteriën in de Peyerse platen en induceren daar een inflammatoire repons die gemedieerd wordt door cytokines, chemokines en neutrofiële granulocyten. Deze vorm van infectie wordt gastroenteritis genoemd en leidt tot diarree en gaat na een aantal dagen vanzelf over. In bepaalde patiënten, zoals mensen met een minder goed functionerend immuunsysteem, kan infectie met deze in principe ongevaarlijke stam wel leiden tot ernstige ziekte. Een ander probleem van *S. enterica* serovar Typhimurium zijn terugkerende infecties. Patiënten leiden dan aan steeds terugkerende infecties met hetzelfde isolaat. Dit is beschreven voor o.a. AIDS patienten en mensen die bestraling hebben ondergaan.

Bij de meeste wetenschappelijke studies naar *Salmonella* wordt gebruikt gemaakt van een in vivo muis model. Infectie met *S. enterica* serovar Typhimurium, wat bij mensen



gastroenteritis veroorzaakt, leidt in muizen tot een ziektebeeld dat overeenkomt met typhoïde koorts en is daarom een goed model voor humane infectie met *S. enterica* serovar Typhi of Paratyphi. De natuurlijke infectieroute is de orale (via de mond), maar experimentele infecties kunnen ook intraveneus (in een ader), intraperitoneaal (in de buikholt), of subcutaan (onder de huid) geïnitieerd worden. Zodra de bacteriën in het bloed terecht komen, verlopen al deze infecties op dezelfde manier en lijken op het verloop van typhoïde koorts in de mens. Binnen een paar dagen verspreiden de bacteriën zich naar de lever en de milt waar ze verblijven en zich vermenigvuldigen in macrofagen. Dit leidt, samen met de influx van immuuncellen (macrofagen en neutrofiële granulocyten), tot een vergroting van de lever en de milt (hepatosplenomegalie). Afhankelijk van het soort muis en de dosis, zullen de muizen als gevolg van de infectie doodgaan, of er wordt een immuunrespons geïnduceerd waardoor de muizen in leven blijven en beschermd zullen zijn tegen een tweede infectie. Natuurlijke bescherming tegen een *S. enterica* serovar Typhimurium infectie wordt o.a. bepaald door de genen *ity* en *lps*. *Ity* is het gen dat codeert voor Nramp1, een membraan fosfoglycoproteïne dat alleen tot expressie wordt gebracht door macrofagen van de reticulo-endotheliale organen zoals lever en milt en dat betrokken is bij de weerstand tegen *Salmonella*. Muizen die het resistente allel van *Nramp1* (*Nramp1*^{G169}) tot expressie brengen kunnen de groeisnelheid van *S. enterica* serovar Typhimurium in vivo controleren zodat er een T cel-gemedieerde immuunrespons kan worden geïnitieerd die nodig is voor de uiteindelijke klaring van de bacteriën. Echter, muizen die het gevoelige allel *Nramp1*^{D169} tot expressie brengen kunnen dit niet en zullen aan de infectie overlijden. Expressie van *Nramp1* wordt aanzienlijk vergroot na activatie van de macrofagen door IFN γ and LPS. Het andere gen dat bescherming biedt is *lps*, het gen dat codeert voor Toll-like receptor 4 (TLR4). TLR4 is een receptor die betrokken is bij de herkenning van lipopolysaccharide (LPS) wat uitbundig tot expressie wordt gebracht door Gram-negatieve bacteriën zoals *Salmonella*. Deze receptor raakt dan geactiveerd en geeft signalen door die de celkern instrueren om bepaalde genen af te schrijven en bepaalde cytokines te maken, waaronder IFN γ , Il-18 en TNF α . Deze cytokines spelen een belangrijke rol in het activeren van macrofagen en dus bij de afweer tegen *S. enterica* serovar Typhimurium. Muizen met een mutatie in het gen dat codeert voor TLR4, zoals in C3H/HeJ muizen, reageren niet op LPS als gevolg van een niet goed functionerend TLR4 en zijn daarom extreem gevoelig voor *S. enterica* serovar Typhimurium infecties.

Bij de afweer tegen *S. enterica* serovar Typhimurium spelen met name macrofagen een belangrijke rol. Macrofagen zijn fagocyterende cellen die uitgerust zijn met een heel scala aan mechanismen om micro-organismen te doden. Echter, *S. enterica* serovar Typhimurium heeft zich volledig aangepast en is in staat om te overleven en zelfs te delen in dit vijandig milieu. Een belangrijk afweermechanisme van de macrofaag tegen micro-organismen is de productie van zuurstofradicalen. Deze radicalen zijn zeer schadelijk en zouden *S. enterica* serovar Typhimurium doden als die zich niet aangepast zou hebben. In het genoom van *Salmonella* bevinden zich twee pathogeniciteitseilanden (SPI-1 en SPI-2) die coderen voor type III secretie systemen (TTSS). SPI-1 is een TTSS die betrokken is bij de opname door de cel. Het codeert voor een soort injectiespuit waarmee bepaalde



eiwitten in de cel geïnjecteerd worden waardoor er allerlei veranderingen in het membraan van de cel optreden en de bacterie opgenomen wordt, zelfs door niet-fagocyterende cellen. Dit proces wordt *Salmonella*-geïnduceerde opname genoemd. *S. enterica* serovar Typhimurium komt dan in een fagosoom terecht waar het kan overleven doordat het tweede TTSS gecodeerd door SPI-2 in werking treedt. Hierbij worden weer eiwitten in het cytoplasma geïnjecteerd waardoor allerlei antibacteriële processen verstoord worden en *S. enterica* serovar Typhimurium kan overleven. Zo wordt via SPI-2 gecodeerde eiwitten o.a. voorkomen dat er superoxide geproduceerd kan worden doordat deze eiwitten de translocatie en vorming van het actieve NADPH oxidase complex voorkomen. Naast SPI-1 en SPI-2 gecodeerde eiwitten spelen ook andere genen zoals *soxR/S*, *phoP/Q* een belangrijke rol in de afweer tegen superoxide en in overleving in de gastheer.

Onderzoek naar de rol van superoxide-resistentiegenen in overleving van *S. enterica* serovar Typhimurium in macrofagen en muizen en onderzoek naar reacterende *Salmonella* infecties leidt uiteindelijk tot meer inzicht in de strategieën die *Salmonella* gebruikt om te overleven.

Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van wat er bekend is over *Salmonella*, de interactie met de gastheer en systemen die een rol spelen bij de afweer tegen superoxide en overleving in macrofagen.

In hoofdstuk 2 wordt het opzetten van een in vivo muizenmodel voor een reacterende *S. enterica* serovar Typhimurium infectie door middel van bestraling en depletie van CD4⁺ T cellen beschreven. Een belangrijke complicatie van *S. enterica* serovar Typhimurium infecties in sommige patiënten is het steeds terugkeren van de infectie. De infectie wordt opgeruimd, maar toch ziet *Salmonella* de kans om zich schuil te houden voor het immuunsysteem en te overleven en weer toe te slaan zodra het immuunsysteem verstoord is. Het is echter nog niet precies bekend waar *Salmonella* zich schuil houdt en welke processen een rol spelen bij de onderdrukking van groei tijdens de fase waarin *Salmonella* zich schuil houdt (persistentie/latentie fase). Reacterende *S. enterica* serovar Typhimurium infecties betreffen met name patiënten die bestraling hebben ondergaan, patiënten met AIDS of andere immunestoornissen. We laten met ons reactivatiemodel zien dat CD4⁺ T cellen een rol spelen bij de onderdrukking van replicatie van *S. enterica* serovar Typhimurium tijdens de fase van persistentie.

Sinds een aantal jaren wordt er voor de behandeling van reumatoïde artritis en de ziekte van Crohn een behandeling toegepast waarbij de patiënten behandeld worden met Infliximab of Ethanecept. Deze vorm van behandeling werkt voor deze patiënten erg goed, maar een groot nadeel van deze vorm van behandeling die in een kleine groep patiënten een rol speelt, is het opspelen van allerlei infecties met intracellulaire pathogenen, zoals *Mycobacterium tuberculosis*. Het kan dan gaan om nieuwe infecties, maar ook om reacterende infecties. De behandeling is gebaseerd op het toedienen van antilichamen gericht tegen tumor necrosis factor α (TNF α). TNF α is een cytokine dat een belangrijke rol speelt bij de activatie van macrofagen en bij de afweer tegen allerlei pathogenen, waaronder *Salmonella*. Voor *Salmonella* infecties is het wel bekend dat neutralisatie van TNF α leidt tot verhoogd risico op ernstige *Salmonella* infecties, maar of deze behandeling



ook tot reactivatie van een latente *Salmonella* infectie leidt, zoals bij latente *Mycobacterium tuberculosis* infectie, is nog onduidelijk. In [hoofdstuk 3](#) is onderzocht of $\text{TNF}\alpha$ ook een rol speelt bij de onderdrukking van *S. enterica* serovar Typhimurium tijdens de fase van persistentie in muizen. In het model dat wij gebruiken hebben we geen reactivatie van de *S. enterica* serovar Typhimurium infectie na behandeling van de muizen met een antilichaam gericht tegen $\text{TNF}\alpha$. Verder hebben we gezien dat toevoeging van anti- $\text{TNF}\alpha$ aan $\text{IFN}\gamma$ -gestimuleerde muizemacrofagen (RAW264.7 cellen) geen effect had op het $\text{IFN}\gamma$ effect van verminderde uitgroei van *S. enterica* serovar typhimurium. Dit zou erop kunnen duiden dat $\text{TNF}\alpha$ een ondergeschikte rol speelt aan $\text{IFN}\gamma$ bij een infectie met *S. enterica* serovar Typhimurium. Zolang $\text{IFN}\gamma$ geproduceerd door CD4^+ T cellen aanwezig blijft, zal de latent aanwezige *S. enterica* serovar Typhimurium onderdrukt blijven en zal geen reactivatie plaatsvinden.

[Hoofdstuk 4](#) behandelt het onderzoek naar mutanten die in staat zijn om langer te overleven in macrofagen. We hebben daarbij *S. enterica* serovar Typhimurium mutanten gemaakt door middel van P22 MudJ transposon insertie. MudJ transposon is een groot stuk DNA dat met behulp van een enzym (een transposase) at random ingebouwd kan worden in het genoom en hierdoor een bepaald, van tevoren niet te voorspellen, gen kan inactiveren. We hebben op die manier verschillende mutanten verkregen die vervolgens geselecteerd zijn op de mogelijkheid om langer te overleven in muizemacrofagen. Uiteindelijk bleven er twee mutanten over die na inverse PCR en sequentie-analyse dezelfde bleken te zijn, omdat het MudJ transposon op precies dezelfde plaats in het genoom was ingebouwd. Bij deze twee mutanten bleek het MudJ transposon ingebouwd te zijn in *rmIC*, het gen dat codeert voor het enzym dTDP-4-deoxyrhamnose 3,5-epimerase dat betrokken is bij de vorming van het O-antigen van het lipopolyaccharide (LPS). Analyse van het LPS liet ook zien dat deze mutant een verkort LPS heeft en lijkt heel veel op een *S. enterica* serovar Typhimurium stam met het ruwe Ra chemotype. Dit is een mutant die het O-antigen mist en alleen het lipid A deel en het core van het LPS heeft. Ook deze Ra mutant bleek in staat om langer te overleven in RAW264.7 cellen en was deze zelfs na 48 uur nog in hoge aantallen aanwezig. Desondanks bleken deze mutanten toch niet in staat om in muizen een ernstige infectie te veroorzaken, wat niet verklaard kon worden door de verhoogde gevoeligheid voor complement in het bloed.

Door random MudJ transposon insertie in wildtype *S. enterica* serovar Typhimurium 14028s hebben we vele mutanten verkregen die vervolgens geselecteerd zijn op gevoeligheid voor het superoxide-genererende stofje menadione. Dit is gedaan door vele kolonies te strijken op agarplaten met en zonder menadione en die mutanten te selecteren die niet groeiden op de platen met menadione en wel op de controle plaat zonder menadione. We hebben op die manier een aantal superoxide-gevoelige mutanten verkregen die vervolgens getest zijn in een in vitro infectie-experiment in RAW264.7 macrofagen zoals weergegeven in [Appendix 1](#). Vervolgens is er met behulp van inverse PCR en sequentie-analyse bepaald waar het MudJ transposon was ingebouwd en welk gen geïnactiveerd was door dit transposon. Eén van de mutanten die op die manier verkregen is staat beschreven in [Hoofdstuk 5](#) en betreft een mutant waarbij het MudJ



transposon was ingebouwd in de promotor regio van het gen *pnp* dat codeert voor PNPase, een enzym dat betrokken is bij de afbraak van RNA en bij de adaptatie van groei bij lage temperaturen en wordt gezien als een regulator van virulentie en persistentie van *S. enterica* serovar Typhimurium. Wij beschrijven een additionele rol voor PNPase in de resistentie tegen superoxide en in overleving in macrofagen.

Bij het onderzoek naar de rol van superoxide-resistentie genen beschrijven we in Hoofdstuk 6 de isolatie en karakterisatie van DLG294, een *S. enterica* serovar Typhimurium mutant waarbij door een MudJ transposon een tot dan toe onbekend gen geïnactiveerd is en dat *sspJ* genoemd is. Het eiwit SspJ wordt niet meer gevormd in de mutant en zorgt ervoor dat de mutant veel gevoeliger is geworden voor menadione, een redox-cycling agens dat superoxide radicalen genereert in de bacterie. DLG294 bleek minder virulent te zijn in vitro in macrofagen en in vivo in muizen. Door *sspJ* op een plasmide constitutief tot expressie te brengen in DLG294 is het fenotype van de mutant hersteld tot dat van de wildtype stam. Hieruit bleek heel duidelijk de rol van SspJ in de afweer tegen superoxide en in virulentie, maar de exacte rol en manier van functioneren is nog niet geheel duidelijk.

DLG294 is nader onderzocht in vivo in muizen, zoals beschreven staat in Hoofdstuk 7. DLG294 induceert bijna geen granulomateuze lesies in de lever na subcutane infectie van *Salmonella*-resistente (Ity^r) C3H/HeN muizen met 3×10^4 CFU en de aantallen bacteriën waren 3 log eenheden lager dan die van de wild-type stam op dag 5 na infectie. Daarentegen was DLG294 wel net zo virulent als wildtype en induceerde het een vergelijkbare leverpathologie in *p47^{phox}*^{-/-} muizen. Deze muizen missen een functioneel NADPH oxidase systeem door het ontbreken van de *p47^{phox}* en kunnen geen superoxide produceren. Ook in beenmergmacrofagen van deze *p47^{phox}*^{-/-} muizen en in X-CGD PLB985 cellen waren de bacterie-aantallen van DLG294 net zo hoog als die van de wild-type stam op 24 uur na infectie. Deze resultaten suggereren dat SspJ een rol speelt bij de resistentie tegen oxidatieve stress en in overleving en replicatie van *S. enterica* serovar Typhimurium zowel in vitro als in vivo.

Macrofagen spelen een belangrijke rol bij *Salmonella* infecties. Ze spelen hierbij een dubbele rol, die van gastheer- en effectorcel. DLG294 is gevoeliger voor superoxide en is geïmmuuniseerd in macrofagen en we weten dat superoxide hierbij een belangrijke rol speelt, maar wellicht dat andere processen ook een rol spelen en ervoor zorgen dat DLG294 slechter in staat is om te overleven. Door de infectie met *S. enterica* serovar Typhimurium zal de macrofaag geactiveerd worden om de bacteriën te doden. Hierbij spelen diverse mechanismen een rol. Wij zijn in Hoofdstuk 8 nagegaan wat het effect is van wildtype en DLG294 infectie op de genexpressie in de macrofagen met behulp van een Affymetrix gene chip. Met deze chip kunnen 6.400 genen tegelijkertijd bestudeerd worden. Wildtype *S. enterica* serovar Typhimurium en DLG294 bleken beide de expressie van vele genen te beïnvloeden, maar er waren geen grote verschillen te zien. Hieruit konden we concluderen dat het feit dat DLG294 slechter in staat is om uit te groeien in macrofagen te wijten is aan de mutatie in *sspJ* en niet aan een veranderde activatiestatus van de macrofagen t.o.v. wildtype geïnfecteerde macrofagen.



Omdat het nog steeds onduidelijk was waarom DLG294 geattenuëerd is en welke rol SspJ precies speelt, hebben we in Hoofdstuk 9 het fenotype van DLG294 nader bestudeerd met behulp van een fenotypische array waarbij tegelijkertijd vele processen bestudeerd kunnen worden. Het fenotype van DLG294 is vergeleken met de wildtype stam en liet zien dat DLG294 beter in staat was om stikstofbronnen te gebruiken voor groei, maar dat het daarnaast gevoeliger is voor een groot aantal antibiotica en voor hoge of lage pH. Daarnaast hebben we gekeken naar de genexpressie van intracellulaire DLG294 en hebben deze vergeleken met de genexpressie van intracellulaire wildtype *S. enterica* serovar Typhimurium. Daaruit bleek dat er slechts een paar kleine verschillen tussen DLG294 en de wildtype stam waren en dat er waarschijnlijk iets mis is met de membraanintegriteit van DLG294 waardoor er meer schadelijke stoffen worden opgenomen en deze stam hierdoor meer schade ondervindt.

Concluderende opmerkingen

Salmonella heeft allerlei complexe mechanismen ontwikkeld om om te kunnen gaan met reactieve zuurstofradicalen. *Salmonella* bezit verschillende afweer barrières die de productie van zuurstofradicalen kunnen voorkomen verschillende of die de aangerichte schade door het beetje schadelijke stoffen dat toch nog gevormd wordt zoveel mogelijk beperken. Bovendien is het zo dat ieder organisme (o.a. *Salmonella* en *E. coli*) dat in de aanwezigheid van zuurstof groeit (aeroob) zichzelf moet kunnen beschermen tegen zuurstofradicalen die door het organisme zelf gemaakt worden of tegen invloeden vanuit de omgeving die de superoxide concentratie in de cel kunnen beïnvloeden. Uitgebreid onderzoek naar mutanten van *E. coli* en *Salmonella* heeft onze kennis over afweermechanismen tegen zuurstofradicalen al behoorlijk vergroot. Maar, zoals ook in dit proefschrift beschreven staat, is het op dit moment niet mogelijk om aan de hand van het in vitro fenotype van een mutant te voorspellen hoe deze zich in vivo zal gaan gedragen. Hoewel mutanten die extreem gevoelig zijn voor extracellulair superoxide waarschijnlijk wel geattenuëerd zullen zijn in vivo, is het toch ook denkbaar dat met deze selectie criteria ook genen geïdentificeerd kunnen worden die niet essentieel zijn voor intracellulaire overleving en voor virulentie van *Salmonella*. Het is duidelijk dat er verschillende afweerbarrières tegen reactieve zuurstofradicalen zijn. Sommige van deze mechanismen zijn alleen van belang bij het omgaan met reactieve zuurstofradicalen in het milieu en bepalen de fitheid van *Salmonella* terwijl andere mechanismen ook van cruciaal belang zijn voor virulentie en bepalen daarmee de overlevingskansen van *Salmonella* in de gastheer. Nieuwe technieken, zoals microarray analyse, hebben al bijgedragen aan onze kennis over de verschillende genen en regulons die betrokken zijn bij afweer tegen oxidatieve stress. In de nabije toekomst zal uitgebreider gebruik van deze technieken een gedetailleerder beeld geven van de regulons die geïnduceerd worden. Zo kan de reactie van *Salmonella* op intra- of extracellulaire superoxide stress onderzocht worden en kan vervolgens de bijdrage van mogelijke virulentiegenen bevestigd worden.



