



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Enhancement of host defense against pathogens by antimicrobial peptides : a new approach to combat microbial drug resistance

Does, A.M. van der

Citation

Does, A. M. van der. (2011, March 29). *Enhancement of host defense against pathogens by antimicrobial peptides : a new approach to combat microbial drug resistance*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16658>

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/1887/16658>

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

Nederlandse samenvatting

Inleiding

De ontdekking van penicilline eind jaren twintig door Alexander Fleming luidde het tijdperk van de antibiotica in. Vanaf de jaren '40 werden infecties bij mens en dier behandelbaar door gebruik van penicilline en later ontdekte antibiotica. Inmiddels heeft het gebruik én misbruik van deze middelen erin geresulteerd dat veel bacteriën en andere ziekteverwekkers resistent zijn geworden tegen veel van de antibiotica. Overmatig of onjuist gebruik van antibiotica heeft zelfs geleid tot micro-organismen die tegen alle bekende antibiotica totaal resistent zijn, gedefinieerd als pan-drug resistentie. Vaak wordt vergeten dat antibiotica slechts hulpmiddelen zijn, bedoeld om het afweersysteem van de patiënt in de gelegenheid te stellen de infectie te overkomen. Geen wonder dus dat problemen rond antibiotica resistentie voornamelijk spelen in een ziekenhuis setting, waar antibiotica toegepast worden om infecties te bestrijden bij patiënten met een verminderde afweer zoals transplantatiepatiënten of hiv-geïnfekteerden.

Door toenemende resistentie voor de gebruikelijke antibiotica is het noodzakelijk dat er snel alternatieven voor deze antibiotica ontwikkeld worden. Het aantal nieuwe middelen dat de komende jaren op de markt komt is echter zeer beperkt, en wat er beschikbaar komt zijn vaak variaties op al bekende antibiotica. Naast onderzoek gericht op nieuwe typen van antibiotica verrichtten universiteiten en bedrijven ook onderzoek naar componenten van de afweer van mens en dier, of varianten daarvan, welke als basis zouden kunnen dienen voor een nieuw model van infectie-bestrijdende medicijnen. Een groep moleculen binnen dit onderzoek zijn de antimicrobiële peptiden (AMPs), kleine eiwitten die in staat zijn om ziekteverwekkers te doden. Deze peptiden kunnen van nature voorkomen in het lichaam van mens of dier, of ze vormen fragmenten van (grotere) eiwitten. Deze peptiden kunnen bovendien *in silico* ontworpen worden met behulp van computer software. Ondanks een grote diversiteit in herkomst hebben AMPs een aantal eigenschappen gemeen. Zo zijn ze vaak positief geladen (kationisch), actief tegen bacteriën (en door hun geheel ander werkingsmechanisme vaak ook actief tegen bacteriën die resistent zijn tegen antibiotica) en kunnen ook anti-schimmel, anti-virale of anti-parasitaire activiteiten vertonen. Daarnaast hebben sommige AMPs anti-carcinogene of afweerregulerende eigenschappen. AMPs werden in de jaren tachtig van de twintigste eeuw eerst geïsoleerd uit poppen van de zijdemot door de Zweedse onderzoeker Hans Boman en zijn medewerkers. In de afgelopen 30 jaar zijn er veel meer AMPs geïsoleerd uit een verscheidenheid aan planten, bacteriën, dieren en de uit mens. Een interessante eigenschap van AMPs betreft hun regulerende effect op het afweersysteem van de gastheer. Aangezien het afweersysteem geen onderscheid maakt tussen antibiotica

resistente en gevoelige micro-organismen, zijn AMPs evenzogoed in staat de gastheer te helpen beide groepen micro-organismen te elimineren. Echter, om AMPs in te kunnen zetten als therapeutisch middel moet nog veel kennis vergaard worden, te beginnen met inzicht in de werkingsmechanismen van deze peptiden.

In dit proefschrift is onderzoek verricht naar twee AMPs van menselijke oorsprong. Ten eerste een AMP bestaande uit de eerste elf aminozuren van het humane antimicrobiële eiwit lactoferrine, genaamd hLF1-11. Lactoferrine is een lichaamseigen eiwit dat aanwezig is in moedermelk, speeksel, traanvocht, en in granules, blaasjes, die aanwezig zijn in een bepaald type afweercel genaamd de neutrofiele granulocyt. Het eiwit bestaat uit 693 aminozuren en heeft een breed scala aan eigenschappen waaronder antimicrobiële, ontstekingsremmende en afweerregulerende activiteiten. Lactoferrine is bij het publiek bekend geworden vanwege stier Herman. Bij deze genetisch gemodificeerde stier was een stukje DNA ingebouwd zodat zijn vrouwelijke nakomelingen humaan lactoferrine zouden produceren in hun melk. Een van de belangrijkste werkingsmechanismen van lactoferrine is het binden van ijzer: hiermee wordt een molecuul dat van essentieel belang is voor de groei van bacteriën weggevangen en wordt verdere uitbreiding van de infectie tegengegaan. Binnen de eerste 47 aminozuren van de N-terminus van het lactoferrine eiwit bevinden zich twee kationische domeinen. Uit onderzoek is gebleken dat het eerste kationische domein, aminozuur 1 tot 11, het meest actieve domein is wat betreft de activiteit van lactoferrine tegen bacteriën en schimmels. Het peptide dat zo ontstaat, hLF1-11 genaamd, is in staat gebleken om de uitgroei van methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en fluconazole-resistente *Candida albicans* in een muizenmodel in te dammen. Ondanks dat hLF1-11 *in vivo* in staat blijkt micro-organismen in hun uitgroei te remmen, blijkt bij *in vitro* experimenten dat het doden van de pathogeen alleen optreedt in media met een lage zout concentratie en niet bij een fysiologische zoutconcentratie (d.w.z., gelijk aan de zoutconcentratie in het lichaam). Op grond van onder andere deze bevinding werd verondersteld dat hLF1-11 meerdere werkingsmechanismen heeft om infecties te bestrijden, mogelijk los van een direct antimicrobieel effect. In dit proefschrift is onderzocht of hLF1-11 een additioneel werkingsmechanisme heeft, waarbij door versterken van het afweersysteem van de gastheer, een infectie beter kan bestreden worden. Daarnaast is onderzocht, hoe hLF1-11 deze effecten in afweercellen bewerkstelligt. De achtergrond gedachte is om hierbij nieuwe therapeutische interventiemogelijkheden bij infecties aan het licht te brengen. Ten tweede is onderzoek gedaan naar een welbekend humaan AMP, genaamd LL-37. Dit peptide, dat 37 aminozuren lang is, wordt geproduceerd door een verscheidenheid aan

cellen in het menselijk lichaam, zoals neutrofielen, monocysten en epitheelcellen. Het komt tot expressie tijdens een infectie. LL-37 is niet alleen actief tegen een brede diversiteit aan ziekteverwekkers, maar is ook in staat de afweer reactie van de mens te reguleren, bijvoorbeeld door afweercellen naar een ontstekingshaard te rekruteren, en door het aangeboren en adaptieve afweersysteem te beïnvloeden. In dit proefschrift is onderzocht of LL-37 vergelijkbare effecten heeft als gevonden voor hLF1-11 op een specifiek onderdeel van het afweersysteem, en of deze effecten AMP specifiek zijn.

Dit proefschrift

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt de ontdekking van antimicrobiële eiwitten en peptiden kort beschreven en wordt het onderzoek samengevat dat voorafgegaan is aan hetgeen in dit proefschrift beschreven wordt. Ook wordt informatie gegeven over het lichaamseigen antimicrobiële peptide LL-37 en over het afweersysteem van de mens. Dit afweersysteem bestaat uit een aangeboren en een adaptief, verworven systeem. Het aangeboren afweersysteem reageert op alles dat als gevaarlijk beschouwd wordt; specificiteit ligt besloten in het type reactie dat een lichaamsvreemd molecule oproept. De belangrijkste afweercellen die hierbij betrokken zijn, betreffen de neutrofielen en mononucleaire fagocyten. Deze laatste groep bestaat uit monocysten, macrofagen en dendritische cellen. Deze cellen zijn in staat ziekteverwekkers te fagocyteren ('opeten'), wat de infectie zal helpen beteugelen of zelfs geheel op zal ruimen. Tevens kunnen ze componenten van deze ziekteverwekkers op hun oppervlakte presenteren aan T-lymfocyten welke deel uit maken van het adaptieve afweersysteem. Enkele cellen uit het brede repertoire aan T-cellen herkennen de structuur en zullen hierop reageren met een specifieke respons tegen de ziekteverwekker.

Het dierexperimenteel model waar hLF1-11 in beproefd is bestrijkt 48 uur. Dit ligt binnen de reactietijd van de aangeboren afweer. Daarnaast bleek hLF1-11 actief in neutropene dieren (d.w.z., in complete afwezigheid van neutrofiele granulocyten) en daarom is onderzocht of hLF1-11 mogelijk effecten uitoefent op mononucleaire fagocyten, afweercellen die in neutropenie immers nog wel aanwezig zijn. Daarbij, hLF1-11 wordt *in vivo* intraveneus ingespoten waardoor monocysten waarschijnlijk deel uit maken van de eerste groep afweercellen die met hLF1-11 in contact komen.

In **hoofdstuk 2** staan de resultaten beschreven over de stimulerende effecten van hLF1-11 op zowel monocysten van muizen als monocysten geïsoleerd uit het bloed van mensen. hLF1-11 bleek de reactie van monocysten op structuren van pathogene micro-organismen, te versterken. Een opmerkelijke bevinding was dat de reactie van monocysten op alle

pathogene structuren die we getest hebben door incubatie van de cellen met hLF1-11 verhoogd werd, met uitzondering van de reactie op componenten van Gram-positieve bacteriën. Zodra afweercellen een infectie in hun nabijheid waarnemen produceren ze moleculen die bewerkstelligen dat monocytën vanuit de bloedbaan het weefsel in migreren (chemotactische factoren) en daar differentiëren tot macrofaag of dendritische cel. Omdat hLF1-11 een modifierend effect had op de reactie van monocytën op pathogene structuren, was een logische vervolgvraag of monocytën die met hLF1-11 geïncubeerd worden ook beïnvloed zouden worden in hun differentiatie tot macrofaag of dendritische cel. De resultaten van onderzoek naar deze vraag staan beschreven in **hoofdstuk 3** en **hoofdstuk 4**.

In **hoofdstuk 3** hebben we monocytën tot macrofagen gedifferentieerd in de aan- of afwezigheid van hLF1-11, en daarna de karakteristieken van de cellen onderzocht. Hierbij hebben wij ons gericht op de differentiatie naar een macrofaag met specifiek ontstekingsbevorderende eigenschappen (de zogenaamde type-1 macrofaag), dat is een macrofaag zoals je die zou verwachten bij een infectie. Macrofagen die gedifferentieerd waren in de aanwezigheid van hLF1-11, bleken naast ontstekingsbevorderende ook ontstekingsremmende moleculen te produceren. Daarnaast reageerden deze macrofagen eerder op pathogene bacteriële structuren dan controle cellen, en waren ze in staat om pathogenen sneller te fagocyteren en vervolgens te doden. Opvallend was dat een korte blootstelling van slechts een uur aan het begin van de incubatie al voldoende was om de differentiatie van monocytën vergelijkbaar te beïnvloeden als wanneer hLF1-11 continu in de kweek aanwezig bleef, d.w.z. voor 7 dagen. Dit suggereert dat het effect van hLF1-11 al vroeg en snel optreedt, nog voor differentiatie van monocyten naar macrofaag. Aangezien een monocyten ook kan differentiëren tot dendritische cel, zijn we in **hoofdstuk 4** het effect van hLF1-11 op deze differentiatie nagegaan. Als monocytën differentiëren tot een dendritische cel in de aanwezigheid van hLF1-11, blijkt deze cel vooral effectiever tegen *C. albicans* te zijn, in vergelijking met controle cellen. Het was opmerkelijk dat, waar de fagocytose van *C. albicans* in aan hLF1-11 blootgestelde dendritische cellen hoger is in vergelijking met controle cellen, de opname van MRSA niet aangedaan en onveranderd is. Wel produceren dendritische cellen die gedifferentieerd zijn in de aanwezigheid van hLF1-11 meer zuurstofradicalen en de moleculen interleukine-6 en 10 na stimulatie met *C. albicans*. Zodra een dendritische cel een pathogeen gefagocyteerd heeft, presenteert de cel fragmenten hiervan aan T-lymfocyten; de dendritische cel wordt dan rijpe dendritische cel genoemd. De uitrijping van de dendritische cel in aanwezigheid van een pathogene structuur blijkt bij hLF1-11-gedifferentieerde dendritische cellen achter te blijven.

Interessant is dat deze cellen in staat blijken om een zogenaamde Th17 reactie te induceren, na opkweken van de cellen met T-lymfocyten. Een Th17 reactie wordt in de literatuur geassocieerd met een anti-schimmel reactie, en is dus consistent met onze eerdere resultaten betreffende een versnelde opname van *C. albicans*.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten beschreven van onderzoek naar de moleculaire mechanismen achter de effecten van hLF1-11 op mononucleaire cellen. Met behulp van fluorescentie microscopie is onderzocht of het peptide aan monocytten bindt en/of in de cel migreert. Dit zou immers verduidelijken of hLF1-11 via een receptor op de cel aangrijpt, of het peptide een target, bindingspartner, binnenin de cel heeft. Met dit onderzoek hebben we kunnen aantonen dat hLF1-11 inderdaad in de cel migreert en bindt aan een targetmolecuul in de cel. Via een zogenaamd 'fishing' experiment met het peptide als aas in een 'vijver' van gelyseerde, uiteengevallen monocytten, hebben we het molecuul dat het sterkste aan hLF1-11 bindt geïdentificeerd als zijnde myeloperoxidase (MPO), een enzym betrokken bij de vorming van zuurstofradicalen. Om na te gaan hoe relevant deze binding is voor de eerder waargenomen effecten van hLF1-11 op monocytten werd onderzocht of hLF1-11 na binding aan MPO het molecuul remt in zijn enzymatische activiteit. Dit bleek het geval. Vervolgens konden we met een commercieel verkrijgbare remmer van MPO vergelijkbare effecten in monocytten en macrofagen induceren als degene die met hLF1-11 werden verkregen. Door het MPO te binden en de enzymwerking te onderdrukken blijkt hLF1-11 in staat om haar regulerend effect op afweercellen en daarmee het afweersysteem uit te oefenen.

Ten slotte hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of het lichaamseigen AMP LL-37 eveneens de differentiatie van monocytten naar macrofagen beïnvloedt. Dit bleek niet alleen het geval, maar ook waren de effecten verschillend van die van hLF1-11 op de differentiatie van monocyten naar macrofagen. LL-37 was in staat om de differentiatie van monocyten tot een ontstekingsremmende macrofaag om te buigen naar een macrofaag met ontstekingsbevorderende eigenschappen. LL-37 kon dit effect zelfs bereiken bij al uitgedifferentieerde macrofagen. Aangezien LL-37 normaliter vrijkomt tijdens ontstekingsreacties en door het afweersysteem ingezet wordt tijdens infectie lijkt in theorie op dat moment een ontstekingsbevorderende macrofaag meer van pas te komen dan een ontstekingsremmende macrofaag, bij de beteugeling van de infectie.

Tot slot

Deze samenvatting begon met de constatering dat er een hoge nood is voor nieuwe antibiotica, en dan vooral antimicrobiële middelen die niet slechts een variatie zijn op de

al bekende middelen. Tegen veel middelen die op een enkele target binnen de bacterie aangrijpen, blijken op den duur resistente micro-organismen geselecteerd te worden. Een manier om dit probleem te omzeilen zou zijn om niet rechtstreeks op de bacterie aan te grijpen, maar indirect, door sturing en ondersteuning van het afweersysteem. Uit het onderzoek beschreven in dit proefschrift blijkt dat hLF1-11 in staat is het aangeboren afweersysteem te versterken door de functie van de betrokken afweercellen te stimuleren. Het adaptieve, verworven afweersysteem blijkt eveneens beïnvloed te worden, al zal verder onderzoek moeten uitwijzen of dit werkelijk bijdraagt aan het beteugelen van infectie *in vivo*. Interessant is dat hLF1-11 ook ontstekingsremmende eigenschappen in de onderzochte afweercellen oproept. Zo'n mechanisme zou de mate van ontsteking afzwakken en daarmee omliggende weefselschade verminderen. De identificatie van myeloperoxidase als belangrijke speler in mediatie van de effecten van hLF1-11, suggereert een nieuwe therapeutische target voor stimulatie en versterking van het afweersysteem.

Aangezien LL-37 andere effecten op afweercellen heeft dan hLF1-11, maakt dit onderzoek duidelijk dat het mogelijk is om het afweersysteem met antimicrobiële peptiden op verschillende wijzen te beïnvloeden. In de toekomst zou het mogelijk kunnen worden de afweerreactie tijdens infectie specifiek te sturen door de productie van lichaamseigen AMPs te activeren, of AMPs van een andere bron in te zetten als geneesmiddel. Doordat AMPs de beperkingen van de huidige antibiotica omzeilen zou een dussdanige ontwikkeling kunnen bijdragen aan het snel groeiende probleem van de behandeling van antibiotica-resistente micro-organismen.

