



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

The role of CD44 and osteopontin in infection and inflammation

van der Windt, G.J.W.

Publication date
2010

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

van der Windt, G. J. W. (2010). *The role of CD44 and osteopontin in infection and inflammation*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Infecties zijn wereldwijd een belangrijke oorzaak van ziekte en sterfte. Longen bestaan uit vele longblaasjes (alveoli) die samen een groot oppervlak vormen om voldoende zuurstof uit ingeademde lucht op te kunnen nemen in het bloed. Door dit grote oppervlak en de continue inademing van lucht met potentiële ziekteverwekkers zoals bacteriën en virussen is de long een gevoelig orgaan voor infectie. Bacteriën hebben het vermogen om zich constant aan te passen aan nieuwe situaties en daarmee resistentie te ontwikkelen tegen het immuunsysteem en antibiotica. Meer inzicht in factoren die betrokken zijn bij de immunoreactie tijdens infectie is daarom nodig om potentiële nieuwe therapieën te ontwikkelen. Een snelle en adequate immunoreactie is noodzakelijk voor een effectieve opruiming van bacteriën. Dit gebeurt onder andere door het uitscheiden van ontstekingsstoffen (cytokines en chemokines) door cellen die aanwezig zijn in de long (o.a. macrofagen), en deze stoffen zorgen voor het rekruteren van andere ontstekingscellen (neutrofielen) die helpen de bacteriën op te ruimen. Echter, deze reactie kan ook schade toebrengen aan het geïnfecteerde weefsel. Ook bij steriele (niet-infectieuze) ontsteking kan de immunoreactie nadelige effecten hebben. CD44 is een eiwit dat op veel verschillende soorten cellen voorkomt, waaronder ontstekingscellen. Het is bekend dat CD44 processen die optreden tijdens infectie en ontsteking kan beïnvloeden, zoals migratie van ontstekingscellen naar de plaats van infectie of schade en het uitscheiden van cytokines en chemokines. CD44 heeft twee belangrijke liganden (stoffen die eraan kunnen binden): osteopontine (OPN) en hyaluronzuur (HA; een stof die vrij komt uit weefsel tijdens ontsteking en de immunoreactie kan versterken of in stand houden). OPN wordt door verschillende cellen uitgescheiden en kan verschillende processen die optreden tijdens infectie beïnvloeden, ook onafhankelijk van CD44. **Hoofdstuk 1** is een algemene introductie waarin de bekende functies van CD44 en OPN worden besproken. Daarnaast worden de infectie- en ontstekingsziekten besproken die relevant zijn voor de studies die in dit proefschrift beschreven worden.

In het eerste deel van dit proefschrift hebben we gekeken naar de rol van CD44 tijdens de ontstekingsreactie veroorzaakt door hyperoxie (inademing van lucht met meer dan 95% zuurstof) of door een bacteriële infectie. Hiervoor maakten we gebruik van controle, wildtype (WT), muizen die we vergeleken met muizen die zodanig genetisch veranderd zijn dat ze geen CD44 of geen OPN kunnen maken (CD44 KO of OPN KO muizen). **Hoofdstuk 2** beschrijft de rol van CD44 tijdens longschade veroorzaakt door hyperoxie. We laten zien dat CD44 KO muizen een verminderde

weerstand tegen hyperoxie hadden: 37.5% van deze muizen stierf binnen de 72 uur durende observatie tijd terwijl alle WT muizen overleefden. Vervolgens vonden we dat CD44 KO muizen meer ontstekingscellen (neutrofielen) en hogere concentraties cytokines en chemokines hadden in de alveolaire ruimte. Opvallend was verder dat CD44 beschermd tegen het kapot gaan van de cellen die de aveoli bekleden (epitheelcellen) en dat er meer eiwit aanwezig was in de alveolaire ruimte van CD44 KO muizen. Dit laatste duidt ook op meer schade omdat het eiwit gelekt is uit de nabijgelegen bloedvatjes. Om te kijken of de beschermende rol van CD44 afhankelijk was van OPN, hebben we OPN KO muizen vergeleken met WT muizen gedurende 72 uur hyperoxie en de bovenstaande processen bekeken. Deze waren niet verschillend tussen de twee groepen muizen. Hieruit concluderen wij dat CD44 beschermt tegen hyperoxie geïnduceerde longschade via een mechanisme dat niet afhankelijk is van interactie met OPN. In **hoofdstuk 3** bestudeerden we de rol van CD44 tijdens sepsis (bloedvergiftiging) veroorzaakt door peritonitis (buikvliesontsteking) als gevolg van intraperitoneale (injectie in de buikholtte) toediening van de bacterie *Escherichia (E.) coli*. CD44 KO muizen hadden hogere cytokine en chemokine concentraties in hun buikholtte. In overeenstemming hiermee bleek dat macrofagen die we uit de buikholtte van ongeïnficeerde CD44 KO muizen hadden gehaald, inderdaad meer van deze stoffen maakten als we ze *ex vivo* (in een kweekchaal) stimuleerden met *E. coli* of een component gezuiverd uit deze bacterie (lipopolysaccharide of LPS) dan macrofagen van WT muizen. De verhoogde cytokine en chemokine productie in de afwezigheid van CD44 kon gedeeltelijk ongedaan gemaakt worden door de macrofagen te stimuleren in de aanwezigheid van serum (celvrije vloeistof die overblijft na stolling van bloed; serum is nodig om cellen *ex vivo* in goede conditie te houden) van WT muizen in plaats van CD44 KO muizen. Het verschil in de productie van cytokines en chemokines bleek niet te bestaan als bloed (met daarin verschillende andere typen ontstekingscellen) werd gestimuleerd met *E. coli* of LPS. Deze resultaten suggeren dat het effect van CD44 op cytokine en chemokine productie door ontstekingscellen afhankelijk is van het type ontstekingscel. In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar de functie van CD44 tijdens pneumonie (longontsteking) veroorzaakt door infectie met *Streptococcus (S.) pneumoniae* (ook wel pneumococcon genoemd) door intranasale (via inademing door de neus) toediening van druppels met bacteriën. Tijdens pneumonie veroorzaakt door infectie met een letale (dodelijke) dosis van deze Gram-positieve bacterie (de indeling Gram-positief en -negatief voor bacteriën is een tweedeling gebaseerd op basale structuren aanwezig op de celwand van een

bacterie) hadden CD44 KO muizen een langere overlevingstijd, wat gepaard ging met verminderde bacteriële uitgroei in de longen, minder verspreiding van de bacteriën naar perifere organen en het bloed, en verhoogde vroege neutrofiel influx (toestroom van gespecialiseerde ontstekingscellen, neutrofielen, die bacteriën opnemen en doden) in de longen van deze muizen. Een nadelig effect van CD44 op de afweerreactie tegen deze bacterie werd bevestigd tijdens infectie met een lagere, subletale (niet dodelijke) dosis, waarbij CD44 KO muizen beter in staat waren om de bacteriën te elimineren. Tevens bleek CD44 belangrijk voor het opruimen van ontstekingscellen en van HA in de longen tijdens de herstelfase van subletale pneumonie. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de resultaten van de studie die beschreven wordt in **hoofdstuk 5**, waarin we gekeken hebben naar de rol van CD44 tijdens Gram-negatieve pneumonie veroorzaakt door *Klebsiella (K.) pneumoniae* infectie. Tijdens infectie met een letale dosis hadden CD44 KO muizen minder bacteriële uitgroei en verspreiding van de bacteriën door het lichaam, verhoogde neutrofiel influx naar de longen en verminderde aanmaak van IRAK-M, A20 en SOCS-3. Deze 3 eiwitten onderdrukken een immuunreactie die tot stand komt door signalering via Toll-like receptoren (TLRs, een soort antennes op cellen die bacteriën of componenten daarvan herkennen en daarop een afweerreactie in gang zetten). Daarnaast hadden CD44 KO muizen opnieuw een verminderde opruiming van de ontstekingsreactie en van HA tijdens de herstelfase van pneumonie veroorzaakt door een subletale dosis van *K. pneumoniae* of door LPS afkomstig van *K. pneumoniae*. Opvallend was dat in tegenstelling tot letale *S. pneumoniae* infectie, CD44 KO muizen geen langere overlevingstijd hadden na een letale dosis van *K. pneumoniae*, wat waarschijnlijk verklaard kan worden door de verhoogde longschade die deze muizen hadden, ook tijdens letale *Klebsiella pneumoniae*. In **hoofdstuk 6** bekeken we de functie van de negatieve TLR regulator IRAK-M, tijdens *K. pneumoniae* en *S. pneumoniae* geïnduceerde pneumonie. De afwezigheid van IRAK-M resulteerde in een sterk verbeterde afweerreactie, wat afgeleid kon worden uit verminderde bacteriële uitgroei in de longen, minder verspreiding van de bacteriën naar andere organen en een snellere aanwezigheid van een ontstekingsreactie in longen van IRAK-M KO muizen. Bovendien overleefden IRAK-M KO muizen langer dan WT muizen. Deze resultaten impliceren dat IRAK-M een remmend effect heeft op de immuunreactie tijdens zowel Gram-negatieve als Gram-positieve pneumonie.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we de rol van OPN in de afweerreactie tegen verschillende luchtweg bacteriën bestudeerd. In **hoofdstuk 7** wordt de rol van

OPN tijdens *K. pneumoniae* infectie beschreven. We laten zien dat de concentraties van OPN in de long en in plasma hoger worden tijdens *Klebsiella pneumoniae* en dat OPN KO muizen gevoeliger zijn voor *K. pneumoniae* infectie zoals af te leiden was uit meer bacteriën in longen van OPN KO dan van WT muizen. Vroege neutrofielmigratie naar de alveolaire ruimte was verminderd in OPN KO muizen na intranasale toediening van *K. pneumoniae* of van LPS gezuiverd uit *K. pneumoniae*. Daarnaast vonden we dat intranasale toediening van OPN resulteerde in neutrofielmigratie naar de alveolaire ruimte, wat onafhankelijk bleek van CD44. Deze resultaten impliceren dat OPN in de alveolaire ruimte zorgt voor het aantrekken van neutrofielen uit het bloed en daarmee van belang is voor een effectieve snelle afweerreactie tegen *K. pneumoniae*. In tegenstelling tot *K. pneumoniae* veroorzaakte pneumonie, bleek OPN een negatief effect te hebben op de afweer tegen *S. pneumoniae* (**hoofdstuk 8**). OPN KO muizen hadden een betere overleving na *S. pneumoniae* veroorzaakte pneumonie, wat gepaard ging met verminderde bacteriële groei in longen, perifere organen en bloed. Daarnaast vertoonden deze muizen minder longschade. In tegenstelling tot pneumococcon pneumonie had OPN geen effect op bacteriële groei in pneumococcon sepsis, bewerkstelligd door het direct in de bloedbaan toedienen van *S. pneumoniae*. Deze data suggereren dat het negatieve effect van OPN op de antibacteriële afweer tijdens pneumococcon pneumonie vooral in de long plaatsvindt. Bovendien was OPN al aanwezig in longen van gezonde ongeïnfecteerde WT muizen en OPN concentraties namen toe tijdens pneumococcon pneumonie. Een interessante bevinding was dat OPN de levensvatbaarheid van *S. pneumoniae* *in vitro* stabiliseerde, wat suggereert dat deze bacterie OPN in de long kan misbruiken voor optimale groei. In **hoofdstuk 9** laten we zien dat OPN ook een negatief effect heeft op de afweer tegen *Burkholderia (B.) pseudomallei*, een Gram-negatieve bacterie die in Zuidoost-Azië en Australië voorkomt en de ernstige ziekte melioidose veroorzaakt. We vonden dat OPN concentraties in plasma (celvrije vloeibare deel van bloed) van melioidose patiënten hoger waren dan in gezonde controles en dat deze nog hoger waren in de patiënten die stierven dan in de patiënten die overleefden. Na succesvolle therapie bij melioidose patiënten waren OPN concentraties weer gedaald naar het niveau van gezonde controles. In WT muizen die intrasaaal geïnfecteerd waren met *B. pseudomallei* bleken de OPN concentraties in longen en plasma ook te stijgen. OPN KO muizen waren meer beschermd tegen melioidose zoals af te leiden was uit een langere overleving, minder bacteriële uitgroei in de longen, verminderde neutrofiel influx in de longen en minder schade aan het longweefsel. In **hoofdstuk 10**

hebben we de rol van OPN tijdens tuberculose (veroorzaakt door intranasale infectie met *Mycobacterium tuberculosis*) bestudeerd. We vonden geen verschillen tussen WT en OPN KO muizen in bacteriële groei, longschade of influx van verschillende afweercellen tijdens de eerste 5 weken na infectie. Ondanks de onveranderde immuunreactie in de vroege fase van tuberculose, hadden OPN KO muizen een licht overlevingsvoordeel en vonden we minder bacteriën en longschade in deze muizen tijdens de chronische fase (8 maanden) van tuberculose. We concludeerden dat in ons muismodel OPN niet essentieel is voor een beschermende immuunreactie tijdens tuberculose en dat tijdens de late fase van tuberculose OPN eerder schade toe brengt aan de gastheer.

Door deze studies hebben wij meer inzicht gekregen in de functie van CD44 en osteopontine tijdens infectie en ontsteking, met name in de long. De effecten van deze eiwitten tijdens bacteriële longinfectie zijn zeer uiteenlopend en het netto effect van CD44 en osteopontine blijkt afhankelijk te zijn van de betreffende bacterie, de dosis daarvan en van de duur van de infectie. Deze kennis kan in vervolgstudies gebruikt worden om specifieke processen tijdens gedefinieerde infectie of ontstekingsziekten nader te bestuderen en vooral om timing van mogelijke nieuwe therapieën af te stemmen.