

Micro-organismen vangen in netten van DNA



Hilda van den Bos

24 mei 2010

Basiseenheid: immunologie

Begeleider: Peter Heeringa

Samenvatting

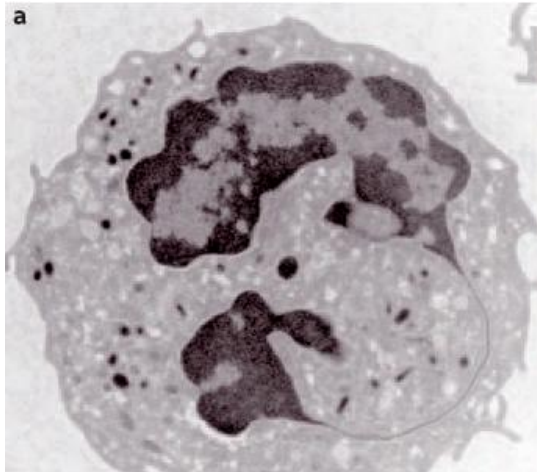
Tot voor kort werd gedacht dat neutrofielen twee strategieën bezitten om pathogenen te bestrijden: fagocytose, waarbij het micro-organisme wordt opgenomen in de neutrofiel en degranulatie, waarbij de neutrofiel de antimicrobiële inhoud van zijn granules laat vrijkomen. Recent is echter ontdekt dat er een derde mechanisme bestaat: de vorming van NETs. Neutrofielen bezitten een uniek mechanisme van celdood waarbij ze instaat zijn hun DNA de cel uit te werpen en hiermee pathogenen te vangen en te doden: NETose. Voordat het DNA de cel uit geworpen wordt verdwijnen de membranen om de kern en de granules, hierdoor wordt het chromatine gemengd met de inhoud van de granules. Het DNA wordt zo 'bepakt' met antimicrobiële stoffen uit de granules, zoals neutrofiel elastase en myeloperoxidase. Een vereiste voor het vrijkomen van NETs is de vorming van reactieve zuurstof moleculen. Hoe dit mechanisme precies werkt is nog onduidelijk, maar zonder reactieve zuurstof vormen neutrofielen geen NETs. NETose is een uniek mechanisme en verschilt duidelijk van apoptose en necrose: het chromatine decondenseert, interne membranen worden afgebroken en de neutrofiel sterft op het moment dat het DNA de cel uit geworpen wordt. Maar waarom zou een neutrofiel kiezen voor NETose in plaats van degranulatie of fagocytose? De neutrofiel gaat er immers dood aan. De vorming van NETs heeft een aantal grote voordelen ten opzichte van de andere strategieën: er treedt fysieke insluiting van de pathogenen op, dit voorkomt verdere verspreiding, er is zeer lokaal een hoge concentratie antimicrobiële stoffen, waardoor het omringende weefsel zo min mogelijk beschadigd raakt. Het belang van NETose wordt bevestigd door de ontdekking van verscheidene ontsnappingsmechanismen die micro-organismen hebben ontwikkeld om aan de NETs te ontsnappen. Zo zijn er micro-organismen die een beschermende capsule vormen, veranderingen aan hun oppervlak hebben ondergaan waardoor de affiniteit voor NETs lager is, in staat zijn NETs af te breken of de vorming van NETs te remmen. Ondanks de belangrijke rol die NETs te spelen in de afweer lijken ze ook betrokken te zijn bij de ontwikkeling van auto-immuunziekten. Mogelijk komt dit doordat stoffen die normaal gesproken alleen intracellulair voorkomen, zoals histonen, vrij komen in de intercellulaire ruimte of de bloedbaan. Bovendien kunnen ook andere imuuncellen gevangen worden in de NETs, waardoor er een complex ontstaat met zowel activerende factoren, zoals cytokines, pathogenen en zelfantigenen. Mogelijk zet deze activatie B-cellen aan tot het produceren van antistoffen tegen zelfantigenen.

Inhoudsopgave

	Pagina nr.
Samenvatting	2
Inleiding	4
NET formatie	5
Reactive zuurstof noodzakelijk voor NET formatie	7
NETose verschilt van apoptose en necrose	9
Onschadelijk maken van micro-organismen met NETs	10
Kiezen voor NET formatie	12
Ontsnappingsmechanismen van pathogenen	14
NETs en de ontwikkeling van auto-immuniteit	16
Referenties	18

Inleiding

Neutrofielen vormen een cruciaal onderdeel van de aangeboren immuniteit. Deze witte bloedcellen worden ook wel polymorfonucleaire cellen of granulocyten genoemd, vanwege de kenmerkende gelobde celkern en granules (fig. 1). Neutrofielen worden gevormd in het beenmerg uit hematopoietische voorlopercellen. De volwassen cellen worden vervolgens



Figuur 1 Ongeactiveerde neutrofiel

afgegeven aan het bloed. Eenmaal in het bloed hebben de neutrofielen een beperkte levensduur. Als er ergens in het lichaam een infectie optreedt, worden de cellen met behulp van ontstekingsmediatoren naar het gebied van de ontsteking geleid. Op de plaats van bestemming aangekomen kunnen de neutrofielen de micro-organismen onschadelijk maken. Tot een paar jaar geleden werd gedacht dat dit via twee mechanismen gaat: door degranulatie of door fagocytose. De granules in de neutrofielen bevatten verschillende antimicrobiële stoffen, zoals hydrolases en antimicrobiële eiwitten. Bij degranulatie fuseren de granules met het

celmembraan waardoor de inhoud vrijkomt op de plaats van infectie. In het tweede geval wordt het micro-organisme opgenomen in de neutrofiel door middel van fagocytose. Vervolgens fuseert het fagosoom met granules tot een fagolysosoom. Hierin wordt het micro-organisme blootgesteld aan een hoge concentratie antimicrobiële eiwitten, enzymen en reactieve zuurstof. Deze stoffen zorgen samen voor het doden van het pathogeen (1).

Tabel 1 Antimicrobiële strategieën van neutrofielen

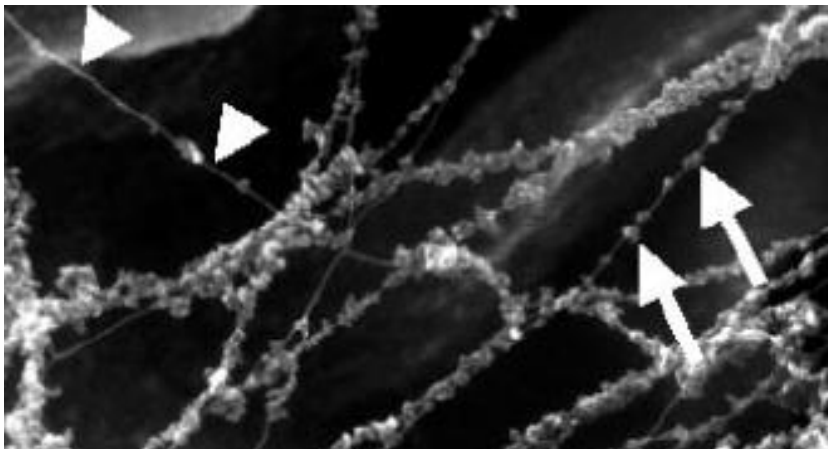
Mechanisme	Benodigde tijd	Kenmerken
Degranulatie	enkele minuten	vrijkomen van antimicrobiële stoffen uit granules
fagocytose	ongeveer 30 minuten	opname van pathogeen in neutrofiel
NETose	minuten tot uren	vrijkomen van chromatine met gebonden antimicrobiële stoffen

Recent is echter aangetoond dat er een derde mechanisme bestaat waarmee neutrofielen micro-organismen onschadelijk kunnen maken: neutrofielen kunnen hun DNA uit de cel werpen waardoor er een netwerk ontstaat waar het organisme in gevangen kan worden (2). Dit proces wordt ook wel NETose genoemd. Aan het DNA van deze NETs (Neutrophil Extracellular Traps) zijn bovendien antimicrobiële stoffen gebonden die ervoor zorgen dat het micro-organisme dood gaat. Dit is kort samengevat in tabel 1. Het gevolg van mechanisme is echter dat ook de neutrofiel dood gaat. Bovendien lijkt het gevaar van auto-immunreacties te bestaan, doordat er stoffen vrijkomen die normaal gesproken alleen intracellulair aanwezig zijn, zoals chromatine en histonen.

In deze scriptie zal ik het antwoord zoeken op de vraag: *Waarom vormen neutrofielen NETs en hoe kan dit mechanisme betrokken zijn bij de ontwikkeling van auto-immunziekten?*

NET formatie

Het feit dat neutrofielen in staat zijn om hun DNA de cel uit te werpen en hiermee pathogenen te vangen is ontdekt door Brinkman et al., in 2004 (2). Sindsdien is er veel onderzoek gedaan naar het mechanisme waarmee, waarom en wanneer NETs gevormd worden. Maar over hoe NET formatie precies in zijn werk gaat is nog veel onduidelijk. Brinkman et al. hebben gevonden dat NETs bestaan uit verschillende types chromatine strengen (Fig. 2). De NETs bestaan ten eerste uit dunne gladde strengen met een diameter van 15 tot 17 nm., aangewezen door de pijlpunten in figuur 2. Op deze strengen zitten complexen gebonden met een diameter van ongeveer 25 nm., zie de pijlen. Deze strengen samen kunnen aggregeren tot dikke bundels.



Figuur 2 Scanning electronen microscopie foto van een NET

In 2006 is het proces van NET formatie onderzocht met live-cell imaging (3). Hierbij kan worden gekeken hoe individuele levende cellen veranderen na stimulatie. Met deze techniek zijn de cellen op vier verschillende manieren tegelijk in de gaten gehouden. Ten eerste is de morfologie van de neutrofielen bepaald door

middel van fasecontrast beelden. Ten tweede zijn de cellen gekleurd met calceïne blauw om de levensvatbaarheid van de cellen vast te stellen. Deze verfstof kleurt namelijk het cytoplasma van levende cellen blauw, maar deze kleuring verdwijnt snel nadat de cel sterft. Ten derde zijn de cellen geïncubeerd met Annexine V dat bindt aan fosfatidylserine, een stof die zich aan de binnenkant van het celmembraan bevindt en geeft vervolgens een groene kleur. Annexine V kan niet door het membraan, waardoor gezonde cellen niet aangekleurd worden. Als de cel in apoptose gaat wordt het fosfatidylserine naar de buitenkant van het membraan getransporteerd, waardoor Annexine V wel kan binden. Ook als het membraan kapot gaat zal de cel groen kleuren omdat Annexine nu wel de cel in kan. Als vierde is de vorming van NETs gemeten door fluorescent gelabelde antilichamen te gebruiken. De NETs kleuren rood als de antilichamen, tegen verschillende histonen en DNA, kunnen binden. Met deze techniek kan dus van één cel tegelijkertijd de morfologie bepaald worden, of de cel in leven is en of er NETs worden gevormd. Daarnaast zijn op verschillende tijdstippen cellen gefixeerd om met transmissie electronen microscopie en fluorescentie microscopie de morfologische veranderingen meer in detail te kunnen bepalen.

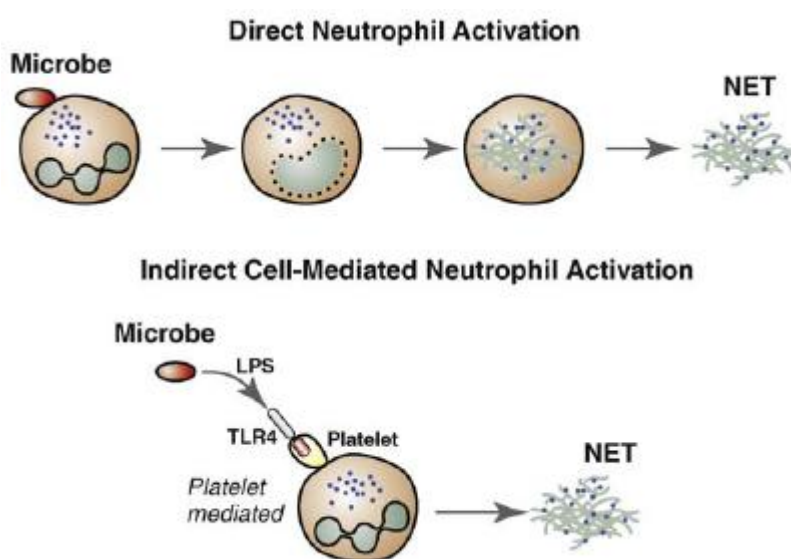
Om er voor te zorgen dat de neutrofielen NETs gaan produceren worden ze geactiveerd met verschillende bacteriën zoals *Staphylococcus aureus* of forbol myristaat acetaat (PMA). PMA zorgt onder andere voor de activatie van proteïn kinase C (PKC). Binnen een paar minuten na de activatie verandert de morfologie van de cellen: ze vlakken af en er ontstaan talrijke intracellulaire vacuoles. De gelobde structuur van de celkernen verdwijnt na 60-80 minuten en nemen toe in omvang tot de kernen bijna de gehele intracellulaire ruimte

vullen. Bovendien begint het chromatine te decondenseren en neemt de ruimte tussen de binnenste en buitenste kernmembraan toe. Op dit moment zijn de neutrofielen nog in leven, het calceïne is namelijk wel te zien maar het Annexine nog niet. In de periode van 120 tot 180 minuten na stimulatie is te zien dat de membranen van de kern en de granules worden afgebroken. Het gedecondenseerde chromatine komt hierdoor vrij in de cel en kan in contact komen met de inhoud van de granules. Aan de hand van een marker, neutrofiel elastase, dat vrij komt uit de granules is te zien dat het chromatine en de inhoud van de granules gemixt worden en het chromatine en elastase associëren. Vanaf 220 minuten gaat van steeds meer cellen het celmembraan kapot en de cellen sterven: de calceïne kleuring verdwijnt terwijl tegelijkertijd de Annexine kleuring zichtbaar wordt. Op ditzelfde moment worden ook de NETs gevormd, histonen en DNA komen buiten de cel waaraan de antilichamen binden die rood gaan fluoresceren. Deze experimenten zijn gedaan onder constante, stabiele omstandigheden, waarbij de neutrofielen op microscopieglasjes liggen (3).

Uit dit experiment kan de conclusie worden getrokken dat voordat NETs ontstaan de interne membranen worden afgebroken, de inhoud van de granules en het chromatine mengen en NETs gevormd worden op het moment dat de neutrofiel dood gaat.

Clark et al. hebben echter recent aangetoond dat er nog een tweede vorm van NET formatie bestaat (4). Ook in de bloedstroom kunnen neutrofielen NETs vormen. Dit mechanisme lijkt wel iets anders te verlopen en veel sneller te gaan: NETs worden binnen enkele minuten na stimulatie gevormd. De neutrofielen kunnen geactiveerd worden door bloedplaatjes, waardoor NETs gevormd worden. Cellen hebben allerlei receptoren waarmee de aanwezigheid van pathogenen waargenomen kan worden. Een voorbeeld hiervan zijn de Toll-like receptoren (TRL). Toll-like receptor 4 (TRL4) op bloedplaatjes kan worden geactiveerd door lipopolysacchariden (LPS) afkomstig van bacteriën, wat binding van de bloedplaatjes aan neutrofielen induceert. Dit zorgt vervolgens voor activatie van de neutrofielen en de vorming van NETs (4).

Het lijkt er dus op dat er twee vormen van NET formatie zijn: een langzame, door directe

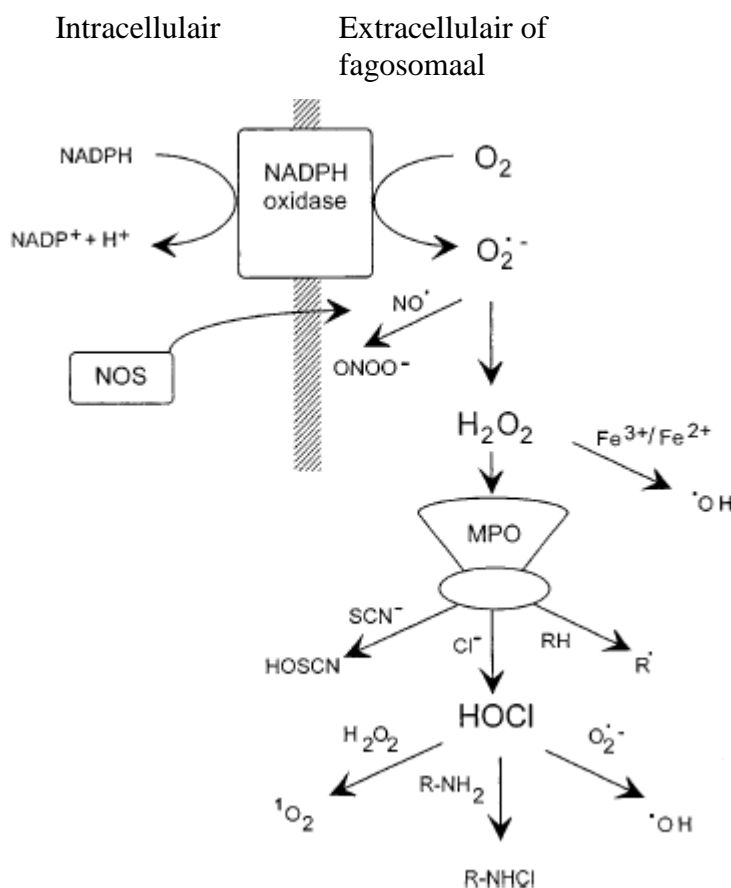


activatie van neutrofielen door microben en een snelle vorm, waarbij indirecte activatie via LPS en bloedplaatjes plaatsvindt. Mogelijk werkt dit indirecte mechanisme zoveel sneller omdat dit plaatsvindt in het stromende bloed, waardoor een heel snelle reactie noodzakelijk is om het pathogeen te kunnen vangen in de NETs. In figuur 3 is samengevat hoe de twee mechanismen werken.

Figuur 3 Twee vormen van neutrofiel stimulatie en NET vorming: langzaam/direct en snel/indirect

Reactive zuurstof noodzakelijk voor NET formatie

Het is al langer bekend dat zuurstofradicalen gevormd worden in fagosomen, zodat het opgenomen pathogeen dood gaat (5). Recenter is ontdekt dat ook voor de formatie van NETs zuurstofradicalen noodzakelijk zijn. Voor de productie van zuurstofradicalen is NADPH-oxidase nodig. Stimulatie van neutrofielen met PMA of levende bacteriën zorgt ervoor dat de subunits van dit enzym complex in elkaar gezet worden in het membraan van het fagosoom. Dit complex oxideert NADPH waardoor er electronen vrijkomen die reageren met zuurstof tot superoxideradicalen ($O_2^{\cdot -}$). Vervolgens wordt dit spontaan of via superoxide-dismutase omgezet tot waterstofperoxide (H_2O_2) en zuurstof (O_2). Myeloperoxidase (MPO) kan vervolgens het H_2O_2 omzetten in hypochloriet (HOCl), zoals te zien is in figuur 4. Deze moleculen worden samen reactive zuurstof (Reactive Oxygen Species, ROS) genoemd, omdat ze reacties aan kunnen gaan met onder andere eiwitten en DNA (5).

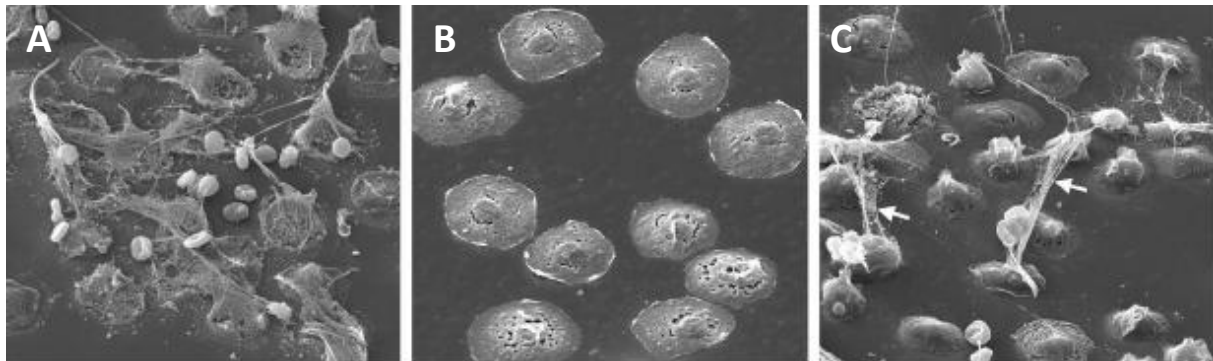


Figuur 4 De vorming van reactive zuurstof in neutrofielen

Meerdere onderzoeken en experimenten hebben aangetoond dat ROS van essentieel belang zijn voor de vorming van NETs. Met de NADPH-oxidase remmer difenyleen iodonium (IPD) kan worden voorkomen dat ROS gevormd worden. Dit heeft tot gevolg dat er ook geen NET formatie kan plaatsvinden (3). Bovendien kan met behulp van glucose oxidase (GO) exogeen H_2O_2 geproduceerd worden. Het is gebleken dat er wel NETs worden gevormd als H_2O_2 exogeen wordt toegevoegd, zelfs als tegelijk de NADPH-oxidase geblokkeerd wordt. Daarnaast is gebleken dat exogeen toegevoegde katalase, dat H_2O_2 afbreekt tot zuurstof en water, de formatie van NETs blokkeert. Het remmen van de katalase activiteit leidt juist tot een verhoogde NET formatie.

Het belangrijkste bewijs van het belang van ROS bij NET formatie is geleverd door genterapie bij een patiënt met chronische granulomatose (CGD) (6). Deze ziekte wordt veroorzaakt door mutaties in de genen die coderen voor de subunits van het NADPH-oxidase complex. Als gevolg hiervan kunnen de neutrofielen geen ROS vormen en hebben de patiënten vaak last van ernstige, terugkerende infecties. De belangrijkste doodoorzaak van patiënten met CGD zijn infecties met de schimmel *Aspergillus*. Het is nog niet duidelijk hoe

infecties met *Aspergillus* gecontroleerd worden bij gezonde personen. Bij patiënten met CGD kan *Aspergillus* onder andere longontsteking veroorzaken (7). Bianchi et al. hebben aangetoond dat goed werkende NADPH-oxidase belangrijk is voor het kunnen bestrijden van *Aspergillus* infecties. Bij een patiënt met CGD en een ernstige invasieve infectie met *Aspergillus nidulans* is genterapie toegepast. Hierbij zijn genen voor de NADPH-oxidase subunits met mutaties vervangen, met behulp van een virale vector, door goed werkende genen. Voor de therapie waren de neutrofielen van de patiënt niet in staat NETs te vormen, maar na de therapie wel, zoals te zien is in figuur 5. De infectie met *Aspergillus* was zes weken na de genterapie volledig opgeruimd door zijn eigen immuunrespons (6).

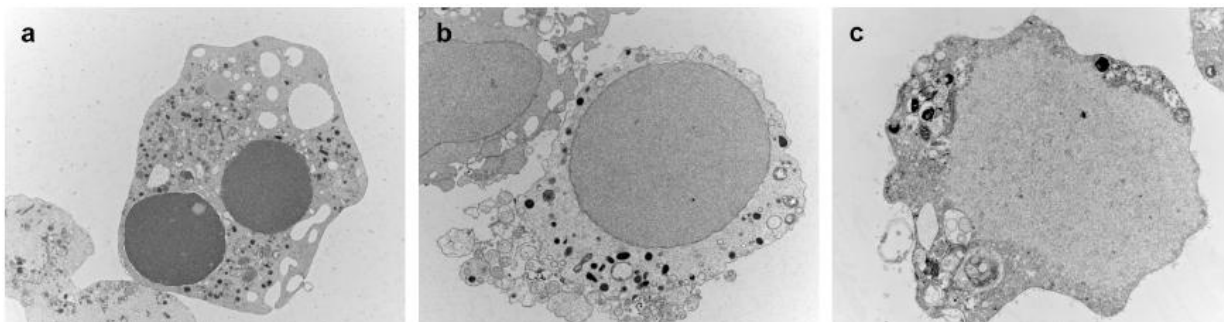


Figuur 5 Scanning elektronenmicroscoop foto's van gestimuleerde neutrofielen van (A) een controle, (B) CGD patiënt voor genterapie, (C) CGD patiënt na therapie.

NETose verschilt van apoptose en necrose

NETose is een unieke vorm van celdood en is duidelijk verschillend van apoptose en necrose (3). Aan de morfologische veranderingen van de cel is goed te zien of de cel in apoptose, necrose of NETose gaat (Fig. 5).

Bij apoptose condenseert het chromatine, het wordt strak opgewonden. De kern fragmenteert in verschillende blaasjes, maar zonder dat de kernvelop kapot gaat. De inhoud van de kern komt dus niet in aanraking met het cytoplasma. De organellen blijven intact en er vormen zich vacuoles in het cytoplasma (8). Bovendien fragmenteert het DNA. Necrotische cellen vertonen heel andere kenmerkende veranderingen. Neutrofielen in necrose verliezen de typische gelobde structuur van de kern, de kern wordt een homogene structuur waarin de scheiding van het chromatine in eu- en heterochromatine verdwijnt. De kernvelop, de organellen en de granules blijven echter intact waardoor er geen menging plaatsvindt van chromatine, cytoplasma en inhoud van de granules. Ook treedt er geen DNA fragmentatie op.



Figuur 5 Morfologische verschillen van een cel in apoptose (a), necrose (b) en NETose (c)

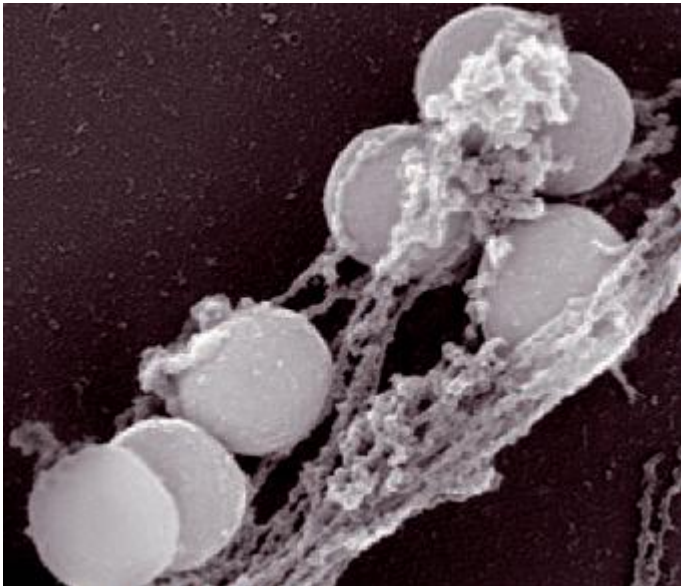
In tegenstelling tot apoptose en necrose komt bij NETose de inhoud van de granules wel vrij in de cel, evenals het chromatine. Het kernmembraan fragmenteert volledig en de membranen van de granules vallen uiteen. Hierdoor kan het chromatine mixen met de antimicrobiële stoffen uit de granules. Bij deze cellen vindt geen DNA fragmentatie plaats. Noch bij cellen in apoptose, noch bij cellen in necrose vindt NET formatie plaats. Dit is bevestigd door het meten van de hoeveelheid extracellulair DNA (3). NETs zijn dus niet het resultaat van één van deze vormen van celdood. NETose, celdood door NET formatie, is een unieke vorm van celdood die duidelijk verschillend is van apoptose en necrose. De kenmerken van de verschillende types celdood zijn kort samengevat in tabel 2.

Tabel 2 Vormen van celdood

	Chromatine	Interne membranen
Apoptose	condensatie wel DNA fragmentatie	fragmentatie van de kern geen contact tussen inhoud van de kern en cytoplasma
Necrose	verdwijnen scheiding eu- en heterochromatine geen DNA fragmentatie	verdwijnen gelobde structuur van de kern geen contact tussen inhoud van de kern en cytoplasma
NETose	decondensatie	afbraak kern en granule membranen wel mengen inhoud van de kern en cytoplasma

Onschadelijk maken van micro-organismen met NETs

Neutrofielen zijn dus in staat hun DNA de cel uit te werpen, maar hoe kan dit mechanisme ervoor zorgen dat micro-organismen onschadelijk worden gemaakt? Diverse studies hebben aangetoond dat NETs zowel bacteriën (2), schimmels (9) als parasieten (10) kunnen binden en onschadelijk maken. Ten eerste raakt het micro-organisme verstrikt in de DNA strengen, letterlijk in een net van DNA, zoals te zien is in figuur 6. Dit voorkomt dat het micro-organisme zich door de rest van het lichaam kan verspreiden. De DNA strengen zijn bezet met allerlei antimicrobiële stoffen. Hierdoor wordt het micro-organisme blootgesteld aan een hoge concentratie antimicrobiële stoffen. Als in plaats van NET formatie degranulatie optreedt, komen de stoffen vrij in de omgeving van de neutrofiel en over een groter gebied. Omdat bij NET formatie de antimicrobiële stoffen gebonden zijn aan het DNA is er lokaal een hoge concentratie van deze stoffen aanwezig. Het zijn deze stoffen die verantwoordelijk zijn voor het doden van het micro-organisme; ze zijn schadelijk voor de celwand en membranen, of remmen de groei van de micro-organismen.



Figuur 6 *Staphylococcus aureus* gevangen in NETs

stadium dood gaat door schade aan het binnenmembraan (11).

Eén van de stoffen aanwezig op NETs is myeloperoxidase (MPO). Deze stof, betrokken bij de vorming van reactieve zuurstof moleculen, is dus niet alleen noodzakelijk voor het doden van gefagocyteerde pathogenen en de vorming van NETs, maar ook aanwezig op de NETs om het pathogeen te doden. Verder is er een eiwit aanwezig genaamd bactericidal / permeability-increasing protein (BPI), wat bindt aan lipopolysacchariden (LPS) aanwezig in de buiten membraan van gramnegatieve bacteriën. Binding van BPI aan LPS zorgt ervoor dat direct de groei van de bacterie geblokkeerd wordt en in een later

Naast deze stoffen vormen verschillende serine proteases een belangrijke rol. Neutrofiel elastase, cathepsin G, proteinase 3 en azurocidine zijn zulke serine proteases. Deze stoffen werken op twee manieren tegen pathogenen. Ten eerste zijn ze in staat bacteriële virulentiefactoren splitsen, waardoor een deel van de schadelijke effecten van bacteriën geneutraliseerd worden (12). Bij hoge concentraties, wat het geval is in NETs, zijn serine proteases sterke antimicrobiële stoffen: door de positieve lading kunnen ze bacteriele membranen binnendringen en ontwrachten. Dit tweede mechanisme is onafhankelijk van de protease activiteit (13). Ook kationische fosfolipases kunnen de celwand van Gram-positief binnendringen en afbreken. Fosfolipases zijn aanwezig in neutrofielen, maar breken geen eiwitten af (14).

Een andere belangrijke component van NETs zijn histonen. Van histonen was al langer bekend dat ze antimicrobiële eigenschappen bezitten (15), maar het nut hiervan was niet bekend. Histonen zijn in staat lysis van de bacteriën te veroorzaken. Histonen werden gedacht alleen intracellulair voor te komen, maar nu het mechanisme van NET formatie bekend is kan ook het belang van de antimicrobiële eigenschappen geplaats worden. (16)

Deze antimicrobiële stoffen op de NETs binden waarschijnlijk aan het chromatine door ladingsinteracties; het DNA is negatief geladen en bindt hierdoor aan de positief geladen, kationische, eiwitten en peptiden. Het oppervlak van bacteriën is weer negatief geladen, waardoor de bacteriën vast kunnen komen te zitten aan de positief geladen eiwitten op de NETs (16).

Veel van deze stoffen zijn niet alleen schadelijk voor micro-organismen, maar ook voor de cellen en weefsels van de gastheer. Het is dan ook een groot voordeel dat deze stoffen gebonden zitten aan het DNA, waardoor het micro-organisme blootgesteld wordt aan een zo hoog mogelijke concentratie, terwijl de schade aan de cellen van de gastheer tot een minimum beperkt blijft.

Kiezen voor NET formatie

Welke factoren zijn bepalend voor de uiteindelijke bestemming van neutrofielen? Hoe wordt bepaald of een neutrofiel NETs gaat vormen en sterft, of het pathogeen fagocyteert en blijft leven? Ook hierover is nog veel onduidelijk, maar er zijn wel hypothesen.

Voor en nadelen van NET formatie ten opzichte van fagocytose en degranulatie

Het grootste voordeel van NETs boven fagocytose is dat met NETs ook grotere microben onschadelijk gemaakt kunnen worden. Als het lichaam bedreigt wordt door een schimmelinfectie, zoals *Aspergillus sp.*, moeten zowel sporen (conidiën) als schimmeldraden (hyfen) onschadelijk worden gemaakt (17). Aangezien de hyfen te groot zijn om gefagocyteerd te worden zijn NETs erg belangrijk voor de bestrijding hiervan. Ook met degranulatie kunnen grotere pathogenen worden aangevallen, maar een groot nadeel van degranulatie is de schade aan het omringende weefsel. Bij degranulatie komen er stoffen vrij die schadelijk zijn voor het pathogeen, maar tegelijkertijd ook schade aan het omringende weefsel kunnen geven. Bij NETs is dit probleem veel minder omdat de antimicrobiële stoffen gebonden zitten aan het chromatine. Er is alleen heel lokaal een hoge concentratie van deze stoffen aanwezig. NET formatie heeft dus grote voordelen ten opzichte van fagocytose en degranulatie, maar ook een groot nadeel: de neutrofiel gaat er dood aan. De beslissing voor welke antimicrobiële strategie de neutrofiel kiest moet dus strikt gereguleerd zijn. De belangrijkste voor- en nadelen van elke strategie staan weergegeven in tabel 3.

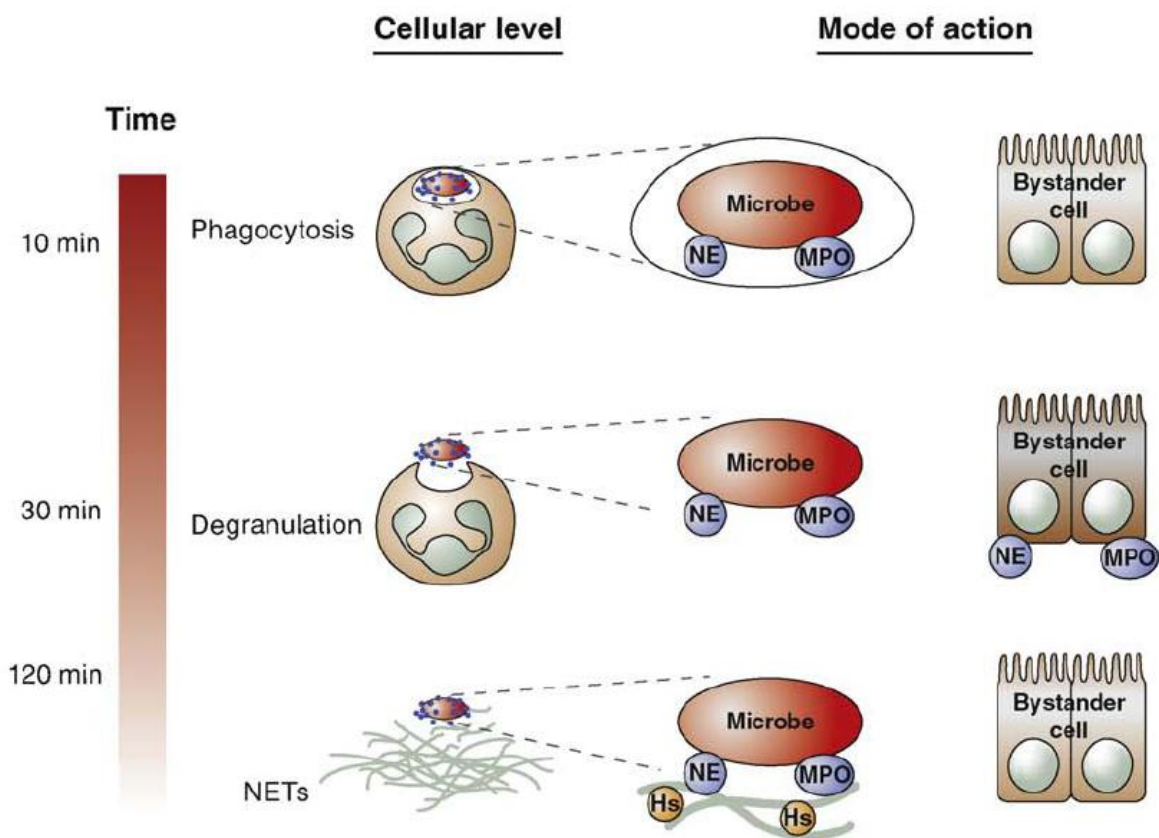
Tabel 3 Voor- en nadelen antimicrobiële strategieën

	Voordelen	Nadelen
Fagocytose	snel nauwelijks schade aan omringend weefsel fysieke insluiting pathogeen	niet mogelijk voor grote pathogenen
Degranulatie	redelijk snel, granules liggen al klaar in de cel	wel schade omringend weefsel door diffusie van antimicrobiële stoffen
NETose	minimale schade omliggend weefsel fysieke insluiting pathogeen toepasbaar voor grote microben hoge lokale concentratie antimicrobiële stoffen	eenmalig: de neutrofiel sterft duurt minuten tot uren voor NETs gevormd worden

Beslissen op basis van timing

Een aannemelijke hypothese is gebaseerd op de verschillende tijd die nodig is voor het uitvoeren van een bepaalde strategie. Uit *ex vivo* experimenten is gebleken dat fagocytose optreedt in enkele minuten en dat voor degranulatie ongeveer 30 minuten nodig zijn. NET formatie vindt pas na enkele uren plaats, zie ook figuur 7 hieronder. Door deze verschillen in tijd is het voor een neutrofiel theoretisch mogelijk om alle drie de strategieën uit te voeren: als eerste fagocytose, vervolgens degranulatie en tot slot NET vorming (16).

Deze hypothese komt overeen met *in vitro* experimenten met *S. aureus* (3). Hiermee is aangetoond dat, in eerste instantie de bacterie hoofdzakelijk wordt aangevallen met fagocytose, terwijl op latere tijdstippen NETs belangrijker zijn.



Figuur 7 verschillende antimicrobiële strategieën van neutrofielen: fagocytose, degranulatie en NET formatie

Ontsnappingsmechanismen van pathogenen

NET formatie lijkt een prachtig systeem van neutrofielen, maar pathogenen hebben al verschillende mechanismen ontwikkeld om aan de NETs te ontsnappen. Zo zijn er pathogenen bekend die de structuur van NETs kunnen afbreken door middel van DNAses, de vorming van NETs kunnen remmen, kunnen voorkomen dat ze verstrikt raken in de NETs of resistentie hebben ontwikkeld tegen antimicrobiële stoffen in de NETs. Het bestaan van deze mechanismen wijst er bovendien op dat NET formatie een belangrijke rol speelt bij de bestrijding van micro-organismen. Deze mechanismen zal ik stuk voor stuk wat verder uitlichten.

Degradatie van NETs door DNAses

Studies hebben aangetoond dat de virulentie van micro-organismen versterkt wordt als NETs worden afgebroken door DNAses. Aangezien de basisstructuur van NETs bestaat uit lange strengen DNA, treedt er degradatie op in aanwezigheid van DNAses. Als het DNA uiteenvalt in kleine stukjes kunnen de microben er niet meer in verstrikt raken en gaat de concentratie antimicrobiële stoffen omlaag. Van verschillende microbes, onder andere *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* en *Staphylococcus aureus*, is bekend dat ze DNAses tot expressie brengen en uitscheiden (18, 19, 20). Studies hebben aangetoond dat de productie van DNAses de virulentie van bacteriën verhoogt en het vermogen van neutrofielen om de bacteriën te doden verlaagt. Remming van de DNase productie leidt juist tot een verhoogde gevoeligheid voor NETs (18).

Tegen dit mechanisme van NET degradatie door DNAses heeft de gastheer een tegenreactie ontwikkeld. De DNAses hebben tweewaardige kationen, zoals Mg^{2+} en Ca^{2+} nodig voor hun werking. Corbin et al. hebben aangetoond dat op de plaats van infectie in hoge concentraties eiwitten aanwezig zijn die deze kationen wegvangen (21). Hierdoor de kationen veel minder beschikbaar voor de bacteriën en kunnen de DNAses hun werking niet goed meer uitvoeren.

Resistentie door oppervlakte veranderingen

Waarschijnlijk binden NETs aan microben doordat ze een tegengestelde lading hebben: het anionische oppervlak van microbes bindt aan de kationische eiwitten op de NETs (16). Door veranderingen aan het oppervlak van het microbiële membraan kan de affiniteit voor NETs verlagen. Sommige bacteriën zijn in staat een beschermende polysaccharide capsule te vormen. Wartha et al. laten zien dat de expressie van bepaalde genen die betrokken zijn bij de vorming van de capsule van *S. pneumoniae*, de binding van de bacterie aan NETs kan verminderen (22). Deze capsule is een klassieke virulentie factor en beschermd het pathogeen tegen NETs. Bovendien heeft deze bacterie een aantal genen, het *dlt* operon, dat de lading van de celwand kan veranderen. Grampositieve bacteriën, zoals *S. pneumoniae*, hebben een dikke celwand die naast peptidoglycaan onder andere bestaat uit bepaalde vetzuren: lipoteichoic acids (LTAs). Genen in het *dlt* operon zorgen er voor dat D-alanine residuen geïncorporeerd worden in de LTAs, wat zorgt voor een positieve lading. Inactivatie van *dltA* versterkt het doden van bacteriën door NETs (22). Het lijkt er dus op dat een meer positief geladen celwand ervoor zorgt dat de bacterie minder goed bindt aan de positief geladen eiwitten in de NETs, waardoor deze eiwitten minder effectief zijn.

Ook *Streptococcus agalactiae* vormt een beschermende capsule. Deze capsule bevat salicylzuurresiduen die veel lijken op een humane glyco-epitop. Recent is aangetoond dat deze bacterie met de salicylzuurresiduen bepaalde receptoren op neutrofielen kan

activeren. Dit heeft vervolgens een remmende werking op de activiteit van de neutrofiel. De vorming van zuurstofradicalen in de neutrofiel wordt geremd en hierdoor ook de vorming van NETs. De salicylzuurresiduen zorgen er dus voor dat *S. agalactiae* moeilijker te doden is door neutrofielen (23).

Biofilm vorming

Veel bacteriën zijn in staat biofilms te vormen. In een biofilm zijn de bacteriën aan een oppervlak of elkaar gehecht in een slijmerige omgeving. Bacteriën in een biofilm hebben andere eigenschappen als 'vrije' bacteriën en zijn beter beschermd tegen invloeden uit de omgeving, zoals antibiotica. De vorming van tandplak is een bekende vorm van biofilm formatie (24). Recent is aangetoond dat *Haemophilus influenzae* zelfs in NETs kan overleven dankzij de bescherming van de biofilm. Dit micro-organisme is in de biofilm resistent tegen zowel fagocytose als NETs. Bovendien heeft *Haemophilus influenzae* lipooligosachariden op het oppervlak die de vorming van biofilms stimuleren (25).

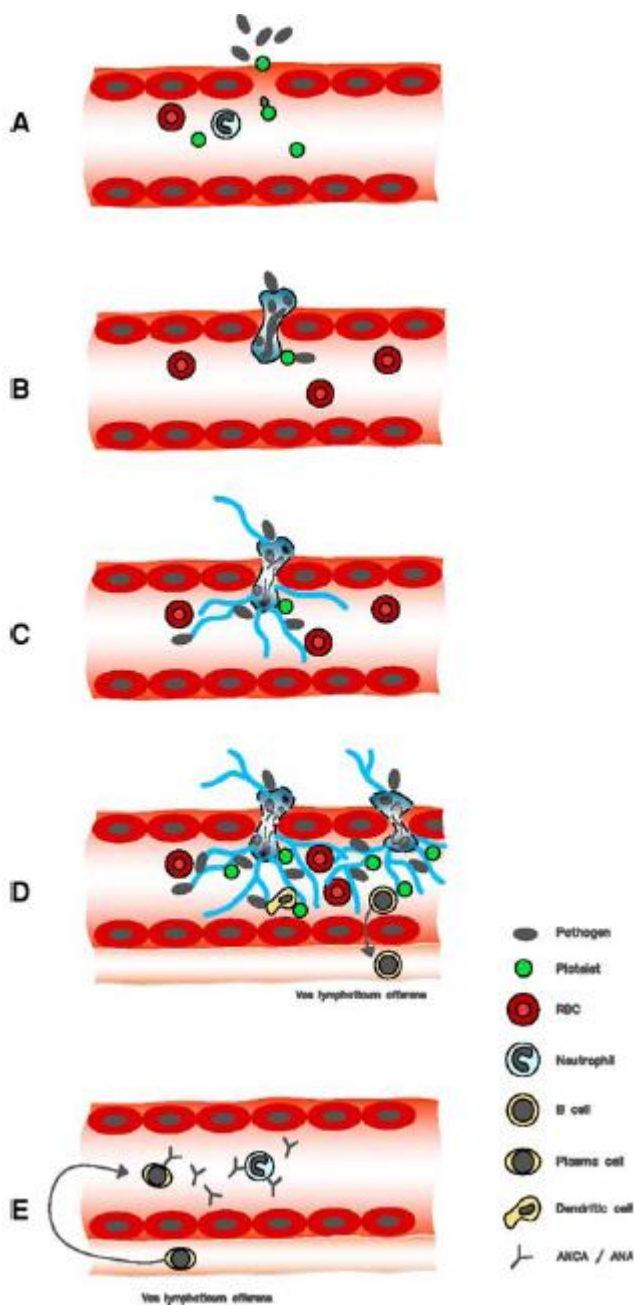
Remming van NET formatie

Op de plaats van een infectie geven epitheelcellen en neutrofielen onder andere het chemokine IL-8 af. Dit chemokine is in staat om neutrofielen sterk aan te zetten tot het vormen van NETs (3). Pathogenen die IL-8 kunnen remmen kunnen er zo dus voor zorgen dat er minder NETs gevormd kunnen worden. *S. pyogenes* brengt een peptidase tot expressie, SpyCEP, dat IL-8 kan splitsen en inactief maakt. De expressie van SpyCEP vermindert de hoeveelheid NETs die gevormd worden en zorgt er op deze manier voor dat het pathogeen beter in staat is om aan de neutrofielen te ontkomen (26).

NETs en de ontwikkeling van auto-immuniteit

De productie van NETs is een belangrijk mechanisme in de bestrijding van pathogenen. Maar tegelijkertijd vormt het een risico op het ontwikkelen van auto-immuunziekten. Er zijn meerder aanwijzingen dat NET vorming bijdraagt aan de ontwikkeling van auto-immuunziekten. Bij auto-immuniteit ziet het immuunsysteem één of meer lichaamseigen stoffen aan voor lichaamsvreemd, ontwikkelt er een immunoreactie tegen en worden autoantistoffen gevormd.

Bij de vorming van NETs komen er stoffen vrij die normaal gesproken alleen intracellulair voorkomen. Dit zijn bijvoorbeeld histonen en het chromatine. Bovendien gebeurt dit in een omgeving waarin een pathogeen bestreden moet worden. Hierdoor zijn er stoffen aanwezig zoals cytokines, die de immunoreactie stimuleren. Dit kan tot gevolg hebben dat tegelijkertijd niet alleen het pathogeen, maar ook lichaamseigen stoffen worden aangevallen. Bijvoorbeeld bij de auto-immuunziekten systemische lupus erythematosus (SLE) en systemische vasculitis, worden er antistoffen gevormd tegen dubbelstrengs DNA, histonen en MPO (27).



Figuur 8 Hypothetisch mechanisme voor de ontwikkeling van auto-immuniteit waar NETs bij betrokken zijn

Een mogelijk mechanisme waarmee auto-immuniteit ontwikkeld kan worden is weergegeven in figuur 8. Er treedt een infectie op met endotheel beschadiging. Dit zorgt voor interacties van het pathogeen met bloedplaatjes en het aantrekken van neutrofielen (A). Vervolgens binden de neutrofielen aan het endotheel en migreren deels door de epitheellaag. Geactiveerde bloedplaatjes zorgen voor verdere stimulatie van de neutrofielen via TLR-4 en fagocytose (B). Door de directe en indirecte activatie wordt de neutrofiel aanzet tot het vormen van NETs. Deze komen zowel in de intercellulaire ruimte als in het bloed terecht. In het bloed worden naast de pathogenen ook

langsstromende bloedcellen gevangen (C). Het complex van NETs, bloedplaatjes en cellen veroorzaakt verdere ophoping van pro-inflammatoire signalen en aantrekken van neutrofielen. Dit leidt ten eerste tot verstopping van het bloedvat. Bovendien zijn in dit complex imuuncellen zoals professionele antigen presenterende cellen (APCs), T-cellen en B-cellen samen met bloedplaatjes en rode bloedcellen sterk verstrikt met zelfantigenen uit de neutrofielen, zoals histonen en MPO. Deze omgeving, met zelfantigenen en activatie van imuuncellen, zou er voor kunnen zorgen dat bijvoorbeeld B-cellen door kruisreacties reactief worden tegen kern- of cytoplasmatische zelfantigenen. De B-cellen kunnen vervolgens migreren naar een lokale lymfeklier (D). Plasma cellen komen het bloedvat binnen via efferente lymfevaten en geven ANAs en of ANCA's af (E).

Het risico op auto-immuunziekten lijkt het groots als er iets mis is in de afbraak van NETs. In dat geval blijven de NETs te lang bestaan wat kan leiden tot stimulatie van de productie van anti-neutrofiel cytoplasmatische antistoffen (ANCA's) of anti nucleaire antistoffen (ANAs). Sommige pathogenen maken gebruik van DNAsen om aan NETs te ontsnappen, maar deze eiwitten lijken ook betrokken bij de normale afbraak van NETs. Twee studies met SLE patiënten hebben aangetoond dat bij deze patiënten inactiverende mutaties aanwezig zijn in de genen coderend voor DNase1 (28,29).

Hakkim et al. hebben recent laten zien dat een verminderde afbraak van NETs geassocieerd is met lupus nefritis (30). Patiënten met SLE vormen autoantistoffen tegen onder andere DNA en histonen. Deze antistoffen kunnen immunocomplexen vormen die lupus nefritis kunnen veroorzaken. Een infectie in deze patiënten zorgt voor een verergering van het ziektebeeld en is een belangrijke doodsoorzaak. Een deel van de patiënten met SLE is minder goed in staat om NETs af te breken door de aanwezigheid van DNase remmers of anti-NET antistoffen die voorkomen dat DNAsen bij de NETs kunnen komen (30). Bovendien hebben Manderson et al. laten zien dat overexpressie van DNase1 in een muismodel van SLE de ontwikkeling van autoantistoffen kan remmen (31).

Maar dit lijkt ook omgekeerd, zichzelf versterkend, te werken: recent hebben Kessenbrock et al. aangetoond dat neutrofielen die gestimuleerd worden met ANCA's NETs vormen en deze NETs bevatten de targets van de antistoffen, zoals MPO, die geassocieerd zijn met vasculitis (32). Van deze antistoffen is bekend dat ze ROS productie in neutrofielen induceren (33). Dit kan de reden zijn dat neutrofielen na stimulatie met ANCA's NETs vormen en de vicieuze cirkel in stand blijft.

Kortom, NETs vormen een belangrijke bescherming tegen microben en zijn een belangrijk onderdeel van de aangeboren immuniteit. Maar als er iets mis is in de regulatie van NETs kan dit leiden tot auto-immuunziekten. Voordat NETose een mogelijke target voor therapie kan worden, bijvoorbeeld remming bij auto-immuunziekten of versterking bij ernstige infecties, moet er nog veel onderzoek gedaan worden naar wanneer en hoe NETs gevormd en afgebroken worden.

Referenties

1. Nathan C. *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol. (2006) Mar;6(3):173-82.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science. (2004) Mar;303(5663):1532-5.
3. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol. (2007) Jan;176(2):231-41.
4. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med. (2007) Apr;13(4):463-9.
5. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood. (1998) Nov;92(9):3007-17.
6. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J. *Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis*. Blood. (2009) Sep;114(13):2619-22.
7. Seger RA. *Modern management of chronic granulomatous disease*. Br J Haematol. (2008) Feb;140(3):255-66.
8. Häcker G. *The morphology of apoptosis*. Cell Tissue Res. (2000) Jul;301(1):5-17.
9. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol. 2006 Apr;8(4):668-76.
10. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps*. Proc Natl Acad Sci U S A. (2009) Apr;106(16):6748-53.
11. Elsbach P. *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense*. J Leukoc Biol. (1998) Jul;64(1):14-8.
12. Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. *Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria*. Nature. (2002) May 2;417(6884):91-4.
13. Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. *Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase*. Science. (2000) Aug 18;289(5482):1185-8.
14. Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J. *Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria*. J Clin Invest. (1999) Mar;103(5):715-21.
15. Hirsch JG. *Bactericidal action of histone*. J Exp Med. (1958) Dec 1;108(6):925-44.
16. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol. (2009) Nov;30(11):513-21.
17. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latgé JP, Brakhage AA, Gunzer M. *Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA*. PLoS Pathog. (2010) Apr 29;6(4):e1000873.
18. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. *DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps*. Curr Biol. (2006) Feb 21;16(4):396-400.

19. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. *Curr Biol*. (2006) Feb 21;(4):401-7.
20. Udou T, Ichikawa Y. *Characteristics of extracellular nuclease production in Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol*. (1979) 23;(7):679-84.
21. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. *Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses*. *Science*. (2008) Feb 15;319(5865):962-5.
22. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. *Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps*. *Cell Microbiol*. (2007) May;9(5):1162-71. Epub 2007 Jan 9.
23. Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A. *Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response*. *Blood*. (2009) Apr 2;113(14):3333-6.
24. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. *Nat Rev Microbiol*. (2004) Feb;2(2):95-108.
25. Hong W, Juneau RA, Pang B, Swords WE. *Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable Haemophilus influenzae persistence in the chinchilla model for otitis media*. *J Innate Immun*. (2009) Apr;1(3):215-24.
26. Zinkernagel AS, Timmer AM, Pence MA, Locke JB, Buchanan JT, Turner CE, Mishalian I, Sriskandan S, Hanski E, Nizet V. *The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A Streptococcus promotes resistance to neutrophil killing*. *Cell Host Microbe*. (2008) Aug 14;4(2):170-8.
27. Cabral AR, Alarcón-Segovia D. *Autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*. (1998) Sep;10(5):409-16.
28. Shin HD, Park BL, Kim LH, Lee HS, Kim TY, Bae SC. *Common DNase I polymorphism associated with autoantibody production among systemic lupus erythematosus patients*. *Hum Mol Genet*. (2004) Oct 15;13(20):2343-50. Epub 2004 Aug 27.
29. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y, Shin HD, Park BL, Kim LH, Lee HS, Kim TY, Bae SC. *Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus*. *Nat Genet*. (2001) Aug;28(4):313-4.
30. Hakkim A, Fürrohr BG, Amann K, Laube B, Abu Abed U, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) May 3. [Epub ahead of print]
31. Manderson AP, Carlucci F, Lachmann PJ, Lazarus RA, Festenstein RJ, Cook HT, Walport MJ, Botto M. *The in vivo expression of actin/salt-resistant hyperactive DNase I inhibits the development of anti-ssDNA and anti-histone autoantibodies in a murine model of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*. (2006) 8(3):R68.
32. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. *Nat Med*. (2009) Jun;15(6):623-5.
33. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1990) Jun;87(11):4115-9.