

PROEFSCHRIFT

De rol van Toll-like receptor agonisten van de meningokok in ziekte en immuniteit

Floris Fransen promoveerde op 11 maart 2010 aan de Universiteit van Utrecht op het proefschrift *Rol van Toll-like receptor agonisten van de meningokok in ziekte en immuniteit*. Uit het onderzoek bleek dat meningokokkenziekte bij ongeveer 10% van de patiënten milder verloopt als gevolg van een gemuteerde bacterie. Het molecuul dat gemuteerd is bij deze bacteriestammen speelt een belangrijke rol in het opwekken van een goede immuunrespons na vaccinatie.

Meningokokkenziekte

De meningokok (*Neisseria meningitidis*) is een bacterie die voorkomt in de keel/neusholte van ruwweg 1,5 miljoen Nederlanders, zonder dat deze mensen daar last van hebben. Af en toe verspreidt de bacterie zich echter naar de bloedbaan of hersenvliezen, waardoor bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking kunnen ontstaan. Wereldwijd zijn er jaarlijks ongeveer 1,2 miljoen gevallen van meningokokkenziekte. Van deze patiënten overlijdt ongeveer 10% en nog eens 20% houdt er blijvende schade aan over. De heftige ontstekingsreactie in deze ziektes wordt voornamelijk veroorzaakt door een belangrijke bouwsteen van de meningokok, lipopolysaccharide (LPS). Immuncellen bezitten een eiwit op hun celmembranen dat specifiek aan LPS kan binden als een sleutel op een slot. Dit eiwit heet toll-like receptor 4 (TLR4). Als LPS aan TLR4 bindt, krijgt de immuncel het signaal om stoffen uit te scheiden die een ontsteking veroorzaken. De bedoeling van die ontsteking is om de bacteriën op te ruimen, maar door de sterke reactie van het immuunsysteem wordt ook het eigen lichaam beschadigd. Het is zelfs zo dat het merendeel van de gebruikelijke symptomen in deze ziektes niet direct door de bacterie zelf worden veroorzaakt, maar door een overactief immuunsysteem.

Toll-like receptor agonisten als adjuvans

Behalve TLR4, de receptor voor LPS, hebben onze cellen nog veel meer receptoren die structuren afkomstig van microben kunnen herkennen. Daarvan zijn receptoren van de toll-like receptorfamilie het bekendst. TLR3 herkent dubbelstrengs RNA van bepaalde virussen, TLR5 bindt aan een eiwit dat door sommige bacteriën wordt gebruikt om voort te bewegen en TLR9 herkent DNA van sommige bacteriën en virussen. Net als bij TLR4 geeft de ontmoeting tussen

deze toll-like receptoren en hun structuur, die zij specifiek kunnen herkennen, een signaal af aan de immuncellen dat iets niet in de haak is. Vervolgens gaan de immuncellen stoffen maken die het immuunsysteem activeren om de indringer uit te schakelen. Samen kunnen toll-like receptoren bijna alle pathogenen herkennen. De maatregelen die het immuunsysteem neemt om de indringer op te ruimen hangen af van welke toll-like receptor wordt geactiveerd, want de strategie om bijvoorbeeld virus of de parasiet uit te schakelen verschilt per soort. Omdat de moleculen die herkend worden door toll-like receptoren het immuunsysteem stimuleren en bovendien de immuunreactie kunnen sturen, zijn deze stoffen zeer geschikt om toe te voegen aan een vaccin om de werkzaamheid te verbeteren. Zulke immuunstimulerende toevoegingen worden adjuvantia genoemd.

Doel van het promotieonderzoek

Bij het Nederlands Vaccin Instituut (NVI) wordt al een tijd gesleuteld aan de LPS-structuur van de meningokok met het doel om een bacteriestam te verkrijgen die geschikter is voor vaccinontwikkeling. Voor de start van dit promotieonderzoek waren al een flink aantal mutanten gemaakt in het laboratorium met elk een iets aangepaste LPS-structuur. Het doel was om deze mutanten te testen op hun geschiktheid als vaccinkandidaat. Ook onderzochten we of LPS vervangen kan worden door andere stoffen die het immuunsysteem kunnen stimuleren. Zoals zo vaak in de wetenschap kreeg de studie een onverwachte wending toen we toevallig stuitte op patiëntisolaten met spontane LPS-mutaties. De impact van deze mutaties is toen verder onderzocht.

Vaccin

Bijna alle meningokokkenstammen die geïsoleerd worden uit patiënten hebben een kapsel. Dat is een soort jasje

gemaakt van bepaalde suikers dat de bacterie omringt en beschermt tegen bepaalde afweermechanismen van ons immuunsysteem. Meningokokken kunnen verdeeld worden in een paar hoofdtypen (serogroepen) gebaseerd op verschillen in de structuur van dit kapsel. Zes verschillende serogroepen (A, B, C, W-135, X, en Y) zijn verantwoordelijk voor bijna alle gevallen van meningokokkenziekte. Van al deze kapsels, behalve type B, zijn vaccins gemaakt die bescherming geven tegen die serogroepen na vaccinatie. Het type B-kapsel wekt helaas nauwelijks een immuunreactie op en is dus niet bruikbaar als vaccin. Type B komt ech-

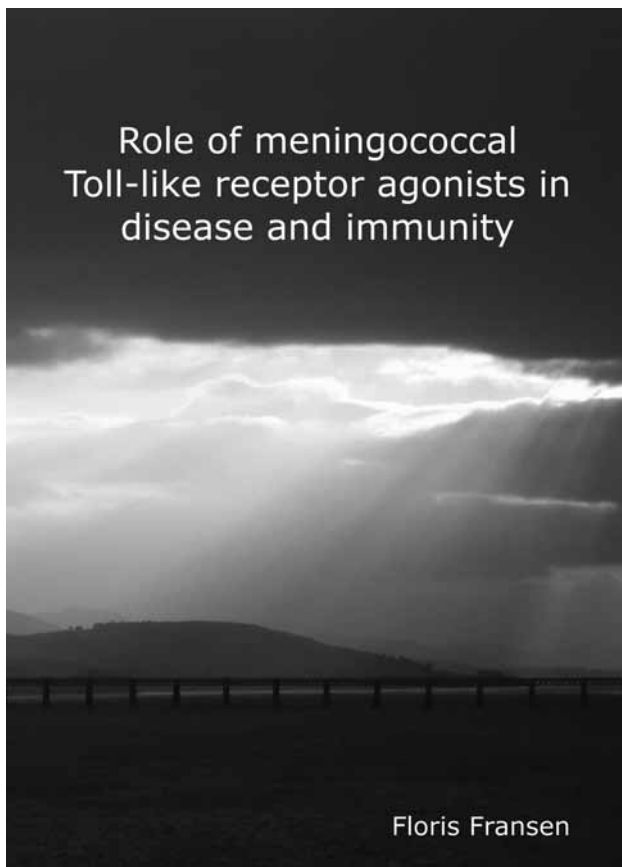
ter het meest voor in Nederland. Daarom is het NVI bezig met de ontwikkeling van een alternatief vaccin tegen deze serogroep. Dit vaccin bestaat uit de buitenmembraan van de bacterie. Aangezien LPS een belangrijk bestanddeel van de buitenmembraan is, bevat het vaccin dus ook LPS. De heftige ontstekingsreactie die LPS kan veroorzaken, maakt een dergelijk vaccin wellicht niet ideaal om mensen mee in te enten. Echter, het is waarschijnlijk dat een veranderde LPS-structuur minder goed worden herkend door immuuncellen en daardoor minder ontstekingsreacties veroorzaken.

LPS belangrijk voor werkzaamheid vaccin

Het huidige prototype buitenmembraanvaccin tegen meningokokken type B met in het vaccin normaal LPS wekt een goede immuunreactie op. De buitenmembraan van deze bacterie bevat onder andere LPS en lipoproteïnen, die herkend worden door respectievelijk TLR4 en TLR2. De bijdrage van deze stoffen aan de werkzaamheid van het vaccin zijn nooit goed onderzocht. Daarom hebben we onderzoek gedaan met muizen waarvan de genen die verantwoordelijk zijn voor de herkenning van LPS (bijvoorbeeld TLR4) en lipoproteïnen (TLR2) geïnactiveerd zijn. Verschillende soorten muizen (normale en mutanten) werden ingeënt met het buitenmembraanvaccin tegen meningokokken type B. Daarna werd de immuunreactie vergeleken tussen de verschillende muizen. Hieruit bleek dat herkenning van LPS door de muis belangrijk is voor een goede immuunreactie na vaccinatie. Tot onze verrassing lieten muizen met een inactivatie van TLR2 een normale immuunreactie zien. Blijkbaar draagt LPS bij aan de werkzaamheid van het vaccin in tegenstelling tot lipoproteïnen.

Vervanging of aanpassing van LPS

Helaas geeft normaal LPS teveel bijwerkingen na vaccinatie. Daarom hebben we, op zoek naar alternatieven de structuren die herkend worden door TLR1-9 onderling vergeleken op de capaciteit om de immuunreactie tegen een buitenmembraanvaccin van een meningokokkenstam zonder LPS, te verbeteren. We hebben gevonden dat structuren die herkend worden door TLR3, TLR4, TLR7, en TLR9 hiertoe in staat waren. Dus naast LPS (activeert TLR4) zouden ook stoffen die TLR3, TLR7, en TLR9 activeren gebruikt kunnen worden als adjuvans om de werkzaamheid van een vaccin tegen meningokokken te verbeteren. Sommige van deze stoffen worden al gebruikt voor bijvoorbeeld therapieën bij mensen en hiervan is bekend dat er geen nare bijwerkingen zijn. Daarnaast laten we zien dat bepaalde LPS-varianten waarvan de structuur is aangepast ten opzichte van normaal LPS ook goed werken als adjuvants, terwijl deze LPS-varianten minder ontsteking veroorzaken, vermoedelijk door slechtere binding aan TLR4.



Role of meningococcal Toll-like receptor agonists in disease and immunity
ISBN 978-90-9025084-7

<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2010-0224-200208/fransen.pdf>

Promotoren: Prof. dr. J.P.M. van Putten, Universiteit Utrecht, Prof. dr. C.J.P. Boog, Nederlands, Universiteit Utrecht, Nederlands Vaccin Instituut, Bilthoven
Co-promotor: Dr. P.A. van der Ley, Nederlands Vaccin Instituut, Bilthoven

Spontane LPS-mutanten

Ongeveer halverwege het promotieonderzoek stuiten we op een meningokokkenstam met een spontane LPS-mutatie geïsoleerd uit een patiënt. We wilden natuurlijk graag weten of infecties met zulke LPS-mutanten vaker voorkomen. Om dit te onderzoeken werden enkele honderden Nederlandse patiëntisolaten gescreend op LPS-mutaties. Hieruit bleek dat bijna 10% van de Nederlandse patiënten met meningokokkenziekte geïnfecteerd is met een stam met een gemuteerde vorm van LPS. Bijna al deze isolaten, op één uitzondering na, hadden een mutatie in hetzelfde gen. Van dit gen wisten we al dat het een bepaald onderdeel toevoegt aan het LPS-molecuul. In de mutanten ontbreekt dit onderdeel. Deze aangepaste LPS-structuur kan veel minder goed binden aan TLR4. Het gevolg is dat de LPS-mutanten immuuncellen minder goed kunnen activeren, waardoor er een geringere ontstekingsreactie ontstaat. Vermoedelijk ontstaan deze mutanten omdat ze detectie door het immuunsysteem beter kunnen vermijden dan normale meningokokken. Verder vonden we dat volwassenen met hersenvliesontsteking die geïnfecteerd zijn met een dergelijke LPS-mutant mildere symptomen hebben dan normaal. Dit komt goed overeen met onze observatie dat deze LPS-mutanten minder ontsteking veroorzaken.

Infecties met LPS-mutanten geassocieerd met leeftijd

In de eerste studie hadden we spontane LPS-mutanten alleen onderzocht in één specifieke groep: volwassenen met hersenvliesontsteking. Echter, de overgrote meerderheid van mensen die geïnfecteerd worden met meningokokken dragen de bacterie een tijdje in de keel/neusholte zonder daar ooit ziek van te worden. Naast hersenvliesontsteking zijn er nog enkele andere aandoeningen mogelijk na infectie met meningokokken. Bovendien, hebben kinderen de grootste kans om ziek te worden. In een tweede studie hebben we de impact van LPS-mutantinfecties onderzocht in deze andere groepen. Hieruit bleek dat naarmate mensen ouder worden ze relatief vaker met een LPS-mutant zijn geïnfecteerd. Ou-

dere mensen hebben vaak meer immuniteit opgebouwd tegen een ziekteverwekker zoals de meningokok, dan jongere mensen. Mogelijk is de LPS-mutatie extra voordelig voor de bacteriën in individuen die al immuniteit hebben tegen meningokokken. Verder vonden we net als in de eerste studie dat de symptomen van oudere mensen na infectie met een LPS-mutant milder zijn dan normaal. Opmerkelijk genoeg gold dit niet voor patiënten jonger dan 5 jaar. Wat we ook totaal niet hadden verwacht was de verdeling van LPS-mutanten in meningokokken geïsoleerd uit de keel/neusholte van dragers. Bij de isolaten uit patiënten was de verdeling van LPS-mutanten gelijk verdeeld over de verschillende genetische varianten van de meningokok. Bij dragerstammen behoorden juist bijna alle LPS-mutanten tot een groep van meningokokken die genetisch zeer sterk verwant zijn. Buiten die specifieke groep bleken de LPS-mutanten vrijwel niet voor te komen, wat suggereert dat normaal gesproken de mutanten geen voordeel hebben bij dragerschap.

Conclusies

Onze resultaten laten zien dat LPS een dominante rol speelt in meningokokkenziekte en immuniteit tegen de bacterie. Het goede nieuws is dat de structuur van LPS kan worden aangepast of worden vervangen door andere stoffen die een minder ernstige ontsteking veroorzaken, maar de immuuncellen nog wel genoeg activeren voor een goede reactie na vaccinatie.

F. Fransen, Biomedical Research Centre IFOM-IEO campus, Milaan, promotieonderzoek uitgevoerd bij het Nederlands Vaccin Instituut
E-mail: ffransen@hotmail.com