

Invloed van Chlamydia pneumoniae infectie op amyloid- β opname.

Bianca Pulinx

promotor :
dr. F. STASSEN

In loving memory...

Pepe...

In my hands

A legacy of memories

I can hear you say my name

I can almost see your smile

Feel the warmth of your embrace

But there is nothing but silence now

Around the one I loved

Is this our farewell?

Sweet darling you worry too much, my child

See the sadness in your eyes

You are not alone in life

Although you might think that you are

Never thought

This day would come so soon

We had no time to say goodbye

How can the world just carry on?

I feel so lost when you are not at my side

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	i
Voorwoord	ii
Samenvatting	iii
1 Inleiding	1
1.1 De ziekte van Alzheimer	1
1.1.1 <i>Genetica van AD</i>	1
1.1.2 <i>Histopathologische kenmerken</i>	2
1.1.3 <i>Aβ in de pathogenese van AD</i>	3
1.2 Rol van microgliacellen bij inflammatie	4
1.2.1 <i>Microgliacellen en Aβ plaques</i>	4
1.3 Microbiële infecties en neurologische ziektes	6
1.3.1 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	6
1.3.2 <i>Chlamydia pneumoniae infectie en de ziekte van AD</i>	8
1.4 Doel van de studie	9
2 Materiaal en Methoden	10
2.1 Celkweek	10
2.2 Infectie van microgliacellen	10
2.3 Blootstelling aan Amyloid-beta ¹⁻⁴²	11
2.4 Reverse transcriptase PCR	11
2.4.1 <i>RNA isolatie</i>	11
2.4.2 <i>DNase behandeling</i>	12
2.4.3 <i>cDNA synthese</i>	12
2.4.4 <i>Reverse transcriptase PCR</i>	12
2.4.5 <i>Data verwerking</i>	13
2.5 ELISA	13
2.5.1 <i>IL-6 sandwich ELISA</i>	13
2.6 Apoptose/necrose	14
2.7 Statistische analyse	14
3 Resultaten	15
3.1 Detectie van mFPR2 mRNA na <i>Chlamydia pneumoniae</i> infectie	15
3.1.1 <i>LPS stimuleert de expressie van mFPR2</i>	15
3.1.2 <i>Invloed van Cpn infectie op de expressie van mFPR2</i>	15
3.1.3 <i>Invloed van blootstelling aan inactief Cpn op de expressie van mFPR2</i>	16

3.2	Detectie van mFPR2 mRNA na <i>Chlamydia pneumoniae</i> infectie en $A\beta_{1-42}$ blootstelling	17
3.2.1	<i>Effect van LPS op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	17
3.2.2	<i>Effect van Cpn op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	18
3.2.3	<i>Effect van in-Cpn op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	18
3.3	Inductie van IL-6 expressie	20
3.3.1	<i>Inductie van IL-6 productie na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	20
3.3.2	<i>Inductie van IL-6 productie na 24u $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	20
3.4	Neurotoxisch effect van de geproduceerde cytokines en $A\beta_{1-42}$	22
3.4.1	<i>Apoptose en necrose na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	23
3.4.2	<i>Apoptose en necrose na 24u $A\beta_{1-42}$ blootstelling</i>	23
4	Discussie	25
	Referenties	29

Lijst met afkortingen

Aβ	Amyloid beta
AD	De ziekte van Alzheimer
APP	Amyloid precursor proteïne
BSA	Bovine serum albumine
CMV	Cytomegalovirus
Cpn	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Ct	Cycle threshold
CZS	Centraal zenuwstelsel
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E	Efficiëntie
EB	Elementair lichaampje
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FAD	De familiale vorm van AD
FCS	Foetaal kalfsserum
FPR	Formyl peptide receptoren
FPRL1	Formyl peptide receptor-like 1
HIV	Humaan immunodeficiëntie virus
HO	Hoechst 33258
HSV	Herpes simplex virus
IFN	Interferon
IL	Interleukine
In-Cpn	Cpn geïnactiveerd door UV licht
LPS	Lipopolysaccharide
mFPR2	Murine formyl peptide receptor 2
MMC	Muis microglia cellen
MOI	Multiplicity of infection
NFT	Neurofibrillaire tangles
ODN	Oligodeoxynucleotide
PBS	Fosfaat gebufferde zoutoplossing
PGN	Peptidoglycaan
pi	Post infectie
PI	Propidium iodide
PS	Preseniline
RB	Reticulair lichaampje
rpm	Rotations per minute
RT-PCR	Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAD	De sporadische vorm van AD
SPG	Sucrose fosfaat glucose oplossing
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor

Voorwoord

Bijna afgestudeerd! Wat zijn die 4 jaar Biomedische Wetenschappen snel omgevlogen. Deze thesis vormt dan ook het sluitstuk van mijn opleiding. De stage, waarop de thesis gebaseerd is, heeft mij echt doen beseffen dat ik mij thuis voel in de wereld van het onderzoek. Dus deze thesis is voor mij dan ook een beginpunt van een nieuwe carrière.

Ietwat schuchter en vooral nieuwsgierig zette ik de eerste stapjes in het onderzoek, hierbij werd ik geholpen door velen die ik op deze manier dan ook wil bedanken.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor Dr. Frank Stassen bedanken, omdat hij mij de kans heeft gegeven stage te lopen op de afdeling Medische Microbiologie in het Academisch Ziekenhuis van Maastricht. Ook wil ik hem bedanken voor zijn hulp bij het schrijven en voor het kritisch nalezen van deze thesis.

Een hele gemeente dankjewel gaat ook uit naar mijn begeleidster Ellen Boelen. Man, wat had ik veel samples! Zonder jouw hulp op het lab had ik nooit zulke resultaten kunnen verkrijgen. Ook wil ik je bedanken voor het nalezen van de eerste ruwe versies van mijn thesis, je hulp bij de statistiek en al de nuttige tips die je mij gegeven hebt.

Tevens wil ik Dionne van Opbergen bedanken, voor het aanleren van vele technieken. Bedankt voor je hulp bij het opwerken van alle samples, zonder jou was ik nooit zo ver geraakt in het onderzoek.

Verder wil ik uit de grond van mijn hart het voltallige personeel en al mijn medestagiaires van de afdeling Medische Microbiologie bedanken. Jullie zorgden voor een aangename werksfeer, waardoor de tijd voorbij vloog. Bedankt om me er thuis te laten voelen!

Tot slot wil ik mijn mama en papa bedanken dat ze mij de kans hebben gegeven om verder te studeren. Dank je wel voor jullie steun en vertrouwen in mij! Joeri en Ilona, jullie zullen het misschien niet beseffen maar ook jullie waren een enorme steun. Mijn vriend Kristof wil ik hierbij bedanken om er altijd voor mij te zijn, no matter what.

Bedankt allemaal,

Bianca

Samenvatting

De ziekte van Alzheimer (AD) wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van geactiveerde microgliacellen rond plaques bestaande uit amyloid- β (A β). A β is in staat microgliacellen te activeren via formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1), met een tweezijdig effect tot gevolg namelijk de opname van het toxische A β , alsook de vrijzet van neurotoxische pro-inflammatoire producten. Recent data toonden een associatie aan tussen *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) infectie en AD, maar een eenduidig mechanisme waardoor Cpn AD kan induceren of verergeren is nog niet gekend. Er werd gesuggereerd dat microbiële infectie, via een verhoging van de FPRL1 expressie in microgliacellen, een uitgesproken effect heeft op de pathogenese van AD. Het doel van deze studie was de invloed van Cpn infectie op de opname van A β te onderzoeken.

De expressie van mFPR2 werd na Cpn infectie gemeten met behulp van RT-PCR. Cpn infectie, met een lage multiplicity of infection (MOI), verlaagde de mFPR2 expressie vergeleken met de controles. Muis microgliacellen (MMC) geïnfecteerd met MOI 5 of behandeld met inactief Cpn (in-Cpn) daarentegen vertoonden meer mFPR2 expressie. Vervolgens werd het effect van Cpn infectie op mFPR2 expressie na A β blootstelling geanalyseerd. Mock-geïnfecteerde MMC blootgesteld aan A β brachten mFPR2 verhoogd tot expressie vergeleken met de controles. Voorbehandeling van MMC met Cpn en de daaropvolgende A β blootstelling (24u) leidde tot een lichte toename in receptorexpressie. Voor analyse van de pro-inflammatoire respons, die ontstaat na activatie van MMC door A β en/of Cpn, werd gebruik gemaakt van een IL-6 ELISA. In het supernatans van mock-geïnfecteerde MMC, voor 30 min blootgesteld aan A β , werden significante hoeveelheden IL-6 gevonden. Voorbehandeling van deze MMC met zowel actief als inactief Cpn zorgde voor een zichtbare toename in de concentratie IL-6. Tot slot werd de neuronale celdood geanalyseerd die optrad na blootstelling aan de cytokines, vrijgezet door MMC als reactie op Cpn en A β . Incubatie van neuronene met het supernatans van mock-geïnfecteerde MMC blootgesteld aan A β (24u), had als gevolg dat het percentage neuronale cellen die necrose ondergingen significant verhoogd werd vergeleken met de controles. Transfer van het supernatans, van MMC blootgesteld aan in-Cpn en A β (24u), naar een neuronale cellijn, leidde tot een verhoging van zowel het percentage apoptotische als, meer uitgesproken, het percentage necrotische cellen.

Deze data tonen aan dat A β in staat is de cytokine-productie door MMC te induceren, mogelijk via mFPR2. Deze pro-inflammatoire cytokines, alsook A β , kunnen een neurotoxisch milieu creëren met neuronale celdood als gevolg. Cpn infectie (MOI 1) kan, door een verlaging van mFPR2 expressie, de progressie in AD verergeren door de directe toxische effecten van A β te moduleren. Anderzijds kunnen cellulaire Cpn-componenten additioneel bijdragen aan neurodegeneratie door een verhoging van mFPR2 expressie, wat de productie van pro-inflammatoire cytokines na A β blootstelling stimuleert.

1 Inleiding

Gedurende de laatste vijftig jaar is de levensverwachting van de Westerse bevolking gestegen, met als gevolg dat meer mensen een leeftijd bereiken waarop neurodegeneratieve ziektes frequenter voorkomen. Vroeger werd dementie beschouwd als een natuurlijk gevolg van veroudering, maar recent is gebleken dat, bij autopsie, meer dan de helft van personen met dementie alle kenmerkende tekenen van de ziekte van Alzheimer (AD) vertoonden (1).

1.1 De ziekte van Alzheimer

AD is een neurodegeneratieve aandoening, dit betekent dat het leidt tot het afsterven van neuronen, voornamelijk in de hippocampus en neocortex. Hierdoor treedt er een gradueel progressief geheugenverlies op alsook cognitieve achteruitgang, uiteindelijk resulterend in dementie (2).

Het eerste klinische symptoom van AD zijn occasionele defecten in geheugenvorming, zoals moeilijkheden met het herinneren van dagdagelijkse handelingen. Deze cognitieve gebreken zullen progressief verergeren, waardoor de patiënt problemen zal ondervinden met uitvoerende functies. Dit betekent dat er moeilijkheden zullen optreden met oriëntatie in tijd en ruimte, alsook moeilijkheden met het uitvoeren van complexe taken. Mogelijk kunnen de patiënten ook leiden aan persoonstoornissen met name angst, agressiviteit, depressie of hallucinaties. De patiënten zullen progressief verslechteren, wat zal leiden tot dementie met een volledige desoriëntatie, een ernstige achteruitgang van het geheugen en globale cognitieve tekorten. Uiteindelijk kan de patiënt immobiel worden en sterven door een banale respiratoire bemoeilijking zoals pneumonie (1).

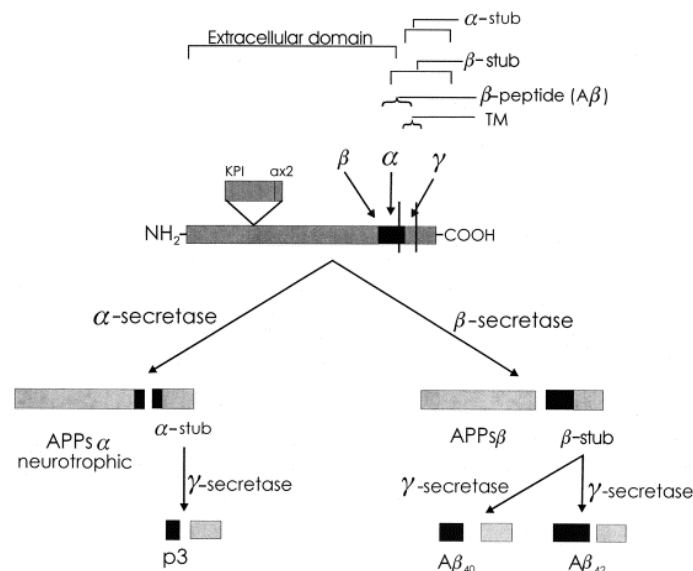
1.1.1 *Genetica van AD*

AD kan zich manifesteren in twee verschillende vormen: familiaal en sporadisch. De familiale vorm van AD (FAD) komt voor bij 10% van de AD patiënten en de symptomen komen tot uiting voor de leeftijd van 65 jaar. FAD is te wijten aan autosomale dominante mutaties in meerdere genen (3). Er is geweten van drie genen dat ze een rol spelen in de pathogenese van FAD, met name het amyloid precursor proteïne (APP) gen op chromosoom 21, het preseniline 1 (PS1) gen op chromosoom 14 en het preseniline 2 (PS2) gen op chromosoom 1. Missense mutaties in deze genen veroorzaken een abnormale processing van APP, wat resulteert in een overproductie van amyloid- β ($A\beta_{42}$) peptides (4). Deze mutaties worden echter niet gevonden bij de latere, sporadische vorm van AD (SAD). SAD is de meest voorkomende vorm van AD (ongeveer 90%), die zich

manifesteert na de leeftijd van 65 jaar. Het initiële mechanisme dat leidt tot de ontwikkeling van SAD is nog niet gekend, alhoewel er al risicofactoren voor SAD vastgesteld zijn. Zo is bijvoorbeeld het ApoE $\epsilon 4$ allel geassocieerd met een verhoogd risico op SAD. Studies hebben aangetoond dat personen met een of meer ApoE $\epsilon 4$ allelen, meer A β plaques hebben vergeleken met personen zonder het ApoE $\epsilon 4$ allel (3).

1.1.2 Histopathologische kenmerken

AD wordt histopathologisch gekenmerkt door intracellulaire neurofibrillaire tangles (NFT's) opgebouwd uit tau eiwitten (4), extracellulaire seniele plaques die voornamelijk bestaan uit A β -peptiden, in het bijzonder A β_{42} , en neuronale celdood (5). Niet-gefosforyleerde tau eiwitten functioneren onder normale condities als een brug tussen de microtubuli van axonen om er voor te zorgen dat ze recht en parallel naar mekaar lopen. Bij AD hecht het hypergefosforyleerd tau eiwit los van de microtubuli en accumuleert het in het soma in de vorm van NFT's. Deze verstoring van het cytoskelet zorgt ervoor dat de axonen afsterven, zo is er dus geen normale informatie stroom mogelijk in de betrokken neuronen (6). Een tweede belangrijk kenmerk zijn de plaques, bestaande uit A β . Dit A β ontstaat door een afwijkende proteolytische processing van het APP, een alomtegenwoordig type I integraal membraan glycoproteïne. De proteolytische verwerking van APP, waarin γ -secretase centraal staat, zorgt voor de vrijzetting van het A β fragment (7).



Figuur 1: Endoproteolytische klievingen van APP staat centraal in AD (8). APP kan gekliefd worden door β -secretase en γ -secretase voor het verkrijgen van A β_{42} of A β_{40} , wat actief gesecreteerd kan worden. APP kan ook gekliefd worden door α -secretase voor het verkrijgen van sAPP α . Dit sAPP α heeft neuroprotectieve en trofische functies.

Het geaccumuleerde A β kan zich afzetten in amyloid plaques in het hersenparenchym van de AD patiënten (7). Het A β peptide kan in verschillende vormen worden vrijgezet, met A β_{40} en A β_{42} als de meest voorkomende vormen. Bij Alzheimer kunnen er twee grote plaque types onderscheiden worden, met name de diffuse en de neuritische plaques. De diffuse plaques bestaan voornamelijk uit A β_{42} . De neuritische plaques daarentegen bevatten fibrillair A β , zowel A β_{40} als A β_{42} . Dit A β_{42} vormt *in vitro* sneller oligomeren en fibrillen vergeleken met A β_{40} . Dit gegeven leidde tot de hypothese dat deze diffuse plaques de precursoren zijn van de neuritische plaques. Tevens is er aangetoond dat de oplosbare A β oligomeren *in vitro* en *in vivo* toxischer zijn dan A β fibrillen (9).

1.1.3 A β in de pathogenese van AD

De accumulatie van A β_{42} peptides speelt een belangrijke rol in de neurodegeneratie bij AD. Een verhoging van A β_{42} , zowel in de fibrillaire als in de niet-fibrillaire vorm, kan direct cytotoxisch zijn voor neuronale cellen. Oplosbaar niet-fibrillair A β_{42} speelt voornamelijk een rol tijdens de vroege fases van AD (7).

Er is geen eenduidig mechanisme van deze directe neurotoxiciteit bekend. Er is gesuggereerd dat A β de calciumhomeostase kan verstoren, mogelijk door interferentie met L-type spanningsafhankelijke calciumkanalen (10). In een andere studie werd aangetoond dat de neurotoxiciteit van A β gereduceerd kan worden via cytochalasine D, een product dat actine polymerisatie en calcium influx inhibeert (11). Andere studies suggereren dat de reactieve zuurstof soorten een rol spelen in de directe toxiciteit van A β (12). Verder is er aangetoond dat A β toxisch is wanneer het geïnjecteerd wordt in de hersenen van oude rhesus apen. Echter, injectie van hetzelfde materiaal in jonge apen heeft een miniem toxisch effect. Dit suggereert dat er naast het pathogene A β , andere leeftijdverwante vatbaarheidfactoren belangrijk zijn voor het verkrijgen van een toxische reactie *in vivo* (13).

De co-lokalisatie van geactiveerde microgliacellen met seniele plaques duidt erop dat deze cellen reageren op een of meer componenten van deze plaques. Deze plaques bestaan voornamelijk uit A β en er is aangetoond dat A β een grote upregulatie kan veroorzaken van de expressie van inflammatoire cytokines door microgliacellen en astrocyten (14). De inductie van interleukine-1 β (IL-1 β) door A β_{1-42} kan relevant zijn voor de progressie van de neuropathologie in AD. IL-1 β kan zelf ook de productie induceren van andere cytokines en eiwitten zoals IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), S100 β en α 1-antichymotrypsine. Deze worden allen gevonden in neuritische plaques in AD. De inductie van de cytokines door IL-1 β kan verhoogd worden door A β -peptides (15). Dus depositie van A β kan zowel direct toxisch zijn voor neuronen, als indirect via de activatie

van microgliacellen, waardoor er mogelijk cytotoxische molecules, cytokines en andere verwante stoffen worden vrijgezet die neurodegeneratie kunnen veroorzaken (9).

1.2 Rol van microgliacellen bij inflammatie

Microgliacellen zijn essentiële componenten in de ontwikkeling, inflammatie en immunologische reacties in het centrale zenuwstelsel (CZS). Deze microgliacellen zijn de residente fagocyten van het aangeboren immuunsysteem, wat de vitale eerste lijnsverdediging is tegen, onder andere, pathogenen en weefselschade (9). Naast hun rol in het aangeboren immuunsysteem hebben deze microgliacellen ook een rol in de verworven immuunreacties; door de inductie van neuroinflammatie na vrijzetting van pro-inflammatoire cytokines en chemokines, fagocytose, cytotoxiciteit en regulatie van de T-lymfocyt responsen via antigeen presentatie. Samenvattend vormen deze microgliacellen de initiële verdediging tegen indringende pathogenen in het CZS, zelfs voordat de leukocyten infiltreren (16).

1.2.1 Microgliacellen en A β plaques

Wanneer microgliacellen geactiveerd worden door A β 42, migreren ze naar seniele plaques in de hersenen van AD patienten en vormen clusters in en rond deze plaques. Door deze activatie zullen de microgliacellen pro-inflammatoire mediators en neurotoxines vrijzetten. Naast dit migratieproces zorgt de activatie van microgliacellen ook voor de verwijdering van A β 42. A β 42 interageert met de microgliacellen via verschillende transmembranaire chemoattractante receptoren. Deze receptoren zorgen ervoor dat de microgliacellen kunnen migreren en accumuleren op plaatsen van inflammatie en infectie.

Er zijn aanwijzingen dat de verwijdering van A β 42 door microgliacellen gebeurt via de formyl peptide receptor-like (FPRL1) (5). FPRL1 is een variant van de formyl peptide receptoren (FPR) welke veelvuldig tot expressie komen op cellen van niet-hematopoëtische oorsprong, zoals op epitheelcellen en endotheliale cellen van de microvasculatuur, alsook op perifere bloed fagocytische leukocyten. Activatie van FPR en FPRL1 door hun agonisten zorgt voor een serie van signalisatie processen die leiden tot celadhesie, chemotaxis, fagocytose, vrijzetting van reactieve zuurstof intermediären en de productie van pro-inflammatoire cytokines. Recent werd aangetoond dat A β 42 een van de FPRL1-specifieke chemotactische agonisten is. FPRL1 zorgt voor de chemotactische werking van A β 42 op microglia en zorgt op die manier voor de rekrutering van microglia naar de lesies (17). A β 42 wordt gebonden aan FPRL1 en wordt snel geïnternaliseerd naar de cytoplasmatische regio. Dit kan een verdedigingsreactie

van de gastheer zijn met als doel het verwijderen van abnormaal en verhoogd pathogenisch A β 42. Naast deze positieve effecten kan de interactie van A β 42 met FPRL1 echter ook geassocieerd worden met cel-activatie en de vrijzetting van pro-inflammatoire en neurotoxische mediators. Een blijvende blootstelling van de cellen aan A β 42 resulteert in de retentie van A β 42/FPRL complexen in het cytoplasmatisch compartiment, wat leidt tot intracellulaire fibrillaire vorming en apoptotische celdood (17).

In de literatuur staat beschreven dat FPRL1 en zijn muishomoloog, formyl peptide receptor 2 (mFPR2), een rol hebben in de chemotactische werking van verschillende peptides geassocieerd met inflammatie, zoals A β en TNF- α , alsook peptides geassocieerd met microbiële infectie, waartoe lipopolysaccharide (LPS) en peptidoglycaan (PGN) behoren.

Een studie van Iribarren et al toonde aan dat de expressie van mFPR2 verhoogd kon worden door stimulatie met TNF- α . Dit had als gevolg dat er een grotere chemotactische reactie ontstond op de mFPR2 agonisten, waartoe ook A β 42 behoort (18).

Cui et al heeft aangetoond dat LPS, een onderdeel van Gram-negatieve bacteriën, selectief de functie van mFPR2 kan moduleren, door verhoging van de gen transcriptie en de eiwitsynthese van deze receptor en dus zo de reacties van de gastheer stimuleren op inflammatoire aandoeningen in het CZS (19).

De microgliacellen brengen naast FPR ook verscheidene Toll-like receptoren (TLR) tot expressie. Deze TLR zijn patroon herkenningsreceptoren aanwezig op de cellen van het aangeboren immuunsysteem. TLR zorgen voor de herkenning van onveranderde moleculaire motieven van bacteriën, schimmels en virussen die essentieel zijn voor de overleving van het pathogeen. Ze zorgen voor activatie van fagocyten en weefsel dendriet cellen met als gevolg de secretie van chemokines en cytokines als reactie op pathogenen en beschadigde gastheercellen. Tevens brengen ze co-stimulerende moleculen tot expressie die nodig zijn voor de beschermende immunoreacties, voor de efficiënte verwijdering van beschadigde weefsels en voor de activatie van de verworven immunorespons. Deze pro-inflammatoire mediators dragen bij aan de verhoogde bloed-hersen barrière permeabiliteit en de resulterende influx van perifere immunocellen naar het hersen parenchym (16).

Er is aangetoond door Chen et al dat Toll-like receptor 2 (TLR2) in muismicroglia cellen (MMC) kan geactiveerd worden door PGN, een component van de celwand van Gram-positieve bacteriën. De activatie van TLR2 in microgliacellen induceert ook de expressie van mFPR2 via ERK1/2 en p38 MAPK-afhankelijke signalisatiepathways. De microgliacellen, geactiveerd door een TLR2 ligand, vertonen een verhoogde endocytose capaciteit van A β 42 via mFPR2 (5). De expressie en functie van mFPR2 in MMC kan ook verhoogd worden door CpG-bevattende oligodeoxynucleotide (ODN), een ligand voor Toll-like receptor 9 (TLR9) (20).

Dus microbiële infectie en pro-inflammatoire stress zouden een uitgesproken effect op de pathogenese van AD kunnen hebben via de up-regulatie van mFPR2 in microglia-cellen (5).

1.3 Microbiële infecties en neurologische ziektes

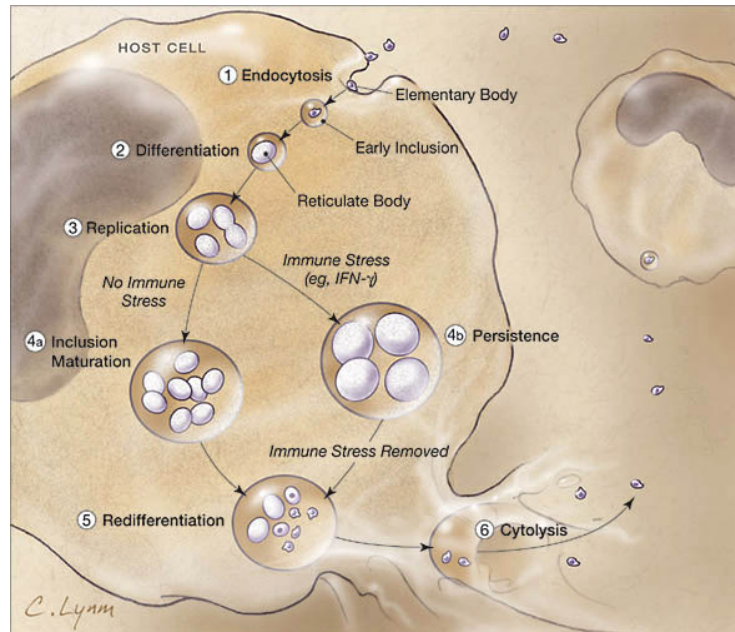
Inflammatie speelt een grote rol in de pathogenese van AD. Eerder is er al aangetoond dat het humane immunodeficiëntie virus (HIV), het herpes simplex virus (HSV) of het cytomegalovirus (CMV) deze inflammatoire respons kunnen stimuleren en zo kunnen bijdragen aan neurodegeneratie. Recent zijn er ook aanwijzingen gevonden dat *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) geassocieerd kan worden met neurodegeneratieve aandoeningen waaronder AD (3; 21).

1.3.1 Chlamydia pneumoniae

Cpn kan acute respiratoire ziektes veroorzaken, inclusief pneumonia, bronchitis, sinusitis en faryngitis. Cpn is een obligate intracellulaire parasiet, die geklassificeerd wordt als een bacterie omwille van de samenstelling van de celwand en de groei door middel van binaire fessie (22). Infecties met Cpn komen veelvuldig voor, naar schatting zijn er jaarlijks 200.000 tot 300.000 gevallen, en Cpn infecties komen het meest voor bij volwassenen. Cpn kan voorkomen in 2 morfologisch verschillende vormen, het kleine (300- tot 400-nm) infectieuze elementaire lichaampje (EB) en het grotere (800- tot 1000-nm) niet-infectieuze reticulair lichaampje (RB). Cpn repliceert niet in de EB vorm, maar is in deze vorm wel infectieus, wat betekent dat Cpn aan receptoren op gastheercellen kan binden en zo de opname door de geïnfecteerde cellen kan stimuleren. De RB vorm is de metabool actieve, replicerende chlamydiale vorm. De veelvuldig eiwitbindingen zijn niet aanwezig in het RB, daardoor is deze vorm osmotisch fragiel. Toch zijn de RB vormen beschermd door hun intracellulaire locatie. Een belangrijke structurele component van Cpn is het genus-specifieke LPS.

Cpn repliceert via een unieke groeicyclus die binnenin de vatbare gastheercellen gebeurt. De cyclus start wanneer de infectieuze EBs zich vasthechten aan de microvilli van levende cellen, vervolgens is er een actieve penetratie naar de gastheercel. Nadat de EBs geïnternaliseerd zijn, verblijft de bacterie binnenin de cytoplasmatische fagosomen, waar de replicatie verder zal gaan. De fusie van cellulaire lysosomen met het EB-bevattende fagosoom en de daaropvolgende intracellulaire doding wordt voorkomen als het buitenste membraan intact is. Wanneer het buitenste membraan beschadigd is of wanneer de bacterie geïnactiveerd werd (door warmte of door antilichamen), dan vindt de fagosomale fusie wel plaats met de daaropvolgende bacteriële doding.

Binnen een tijdspanne van 6 tot 8 uur na binnendringen in de gastheercel, zullen de EBs zich herorganiseren tot de metabool actieve RBs. De RBs zijn in staat hun eigen DNA, RNA en eiwitten te synthetiseren, maar kunnen de hoog-energetische fosfaat verbindingen niet zelf synthetiseren. De RBs repliceren via binaire fessie gedurende de volgende 18 tot 24 uren. Het gevormde fagosoom, met de geaccumuleerde RBs, wordt een inclusie genoemd. Na deze 18 tot 24 uren post-infectie herorganiseren de RBs zich tot de kleinere EBs en tussen de 48 en 72 uur zal de cel ruptureren waardoor de infectieuze EBs vrijkomen (23).



Figuur 2: Levenscyclus van *Chlamydia pneumoniae* (24). Chlamydiale EB hechten aan de gastheercel en ondergaan endocytose (1). Het pathogeen voorkomt fagosoom-lysosoom fusie en differentieert in het RB (2) en start met repliceren binnenin de inclusie (3). Replicerende RB kunnen terug differentiëren in EB (4a en 5) en lyseren de gastheercel voor een nieuwe infectie ronde (6). Tijdens periodes van immuunstress, zoals de aanwezigheid van IFN- γ , kan het pathogeen een niet-infectieuze, niet-replicerende persistente vorm aannemen (4b); als de stress verwijderd wordt, kan het pathogeen redifferentiëren naar de infectieuze EB om een nieuwe infectiecyclus te starten. IFN- γ : interferon gamma.

Cpn kan verschillende humane cellen infecteren zoals epitheliale, endotheliale en gladde spiercellen alsook macrofagen, monocytten en lymfocytten. Klinische persistentie is een essentieel element van de chlamydiale pathogenese. Wanneer de gastheer het pathogeen niet volledig kan elimineren, ontstaat er een chronische infectiviteit. Cpn is reeds geassocieerd met chronische ziektes zoals reactieve artritis, atherosclerose, AD en multiple sclerose (25).

1.3.2 *Chlamydia pneumoniae* infectie en de ziekte van AD

Er wordt verondersteld dat omgevingsfactoren, waartoe infecties kunnen behoren, een rol hebben in de ontwikkeling van SAD. In de literatuur wordt beschreven dat Cpn infectie mogelijk geassocieerd kan zijn met SAD.

Tijdens een post-mortem analyse van hersenmateriaal werd Cpn gevonden bij 17 van de 19 AD patiënten met de late vorm van AD door middel van PCR, immunohistochemie en elektronenmicroscopie. Bij de controle groep kwam Cpn enkel voor bij 1 van de 19 personen (21). Deze chlamydiale infectie kan een inflammatoire respons uitlokken via de upregulatie van de cytokine productie van de geïnfecteerde of naburige cellen. Dit is mogelijk door directe infectie, door LPS en door de productie van heat shock proteïnen. Pro-inflammatoire cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) en de Th1-geassocieerde cytokines (interferon-gamma (IFN- γ) en IL-12) worden gevonden op plaatsen van chlamydiale infectie (26). Verhoogde inflammatie in de AD hersenen is, volgens sommigen, het resultaat van de A β -depositie. Maar omdat infecties een sterke inflammatoire respons teweeg brengt, kan een infectie dus ook deels verantwoordelijk zijn voor de inflammatie die gezien wordt in de hersenen van AD-patiënten (26). Little heeft in zijn *in vivo* onderzoek aangetoond dat bij non-transgene BALB/c muizen Cpn-infectie alleen al voldoende was om een AD-achtige pathologie te induceren. Deze groep is van mening dat oplosbare factoren van Cpn, zoals LPS, een invloed kunnen hebben op de processing van amyloïd op plaatsen die distaal van de geïnfecteerde cellen gelegen zijn. Dit betekent dat Cpn een initiële stimulus kan zijn die A β processing en depositie activeert. Dus de experimentele inductie van een AD-achtige pathologie bij jonge niet-transgene muizen na Cpn infectie kan parallel zijn aan de vroege ontwikkeling van sporadische AD (3).

Recent is aangetoond dat Cpn *in vitro* hersencellen kan infecteren. Eens Cpn in de hersenen aanwezig is, kan het een pro-inflammatoir cerebraal milieu creëren, deels door activatie van microgliacellen. Dit kan uiteindelijk leiden tot neuronale celdood en progressie of zelfs initiatie van neurodegeneratieve ziektes zoals AD (27).

Niet iedereen is echter van mening dat Cpn een risicofactor is in de pathogenese van SAD. Ring en Gieffers konden tijdens hun studies geen Cpn aantonen in weefsels van AD patiënten. Hieruit concludeerden zij dan ook dat er tussen Cpn en de neuropathologie van SAD een kleine associatie mogelijk is, maar dat Cpn zeker geen belangrijke factor is in de ontwikkeling van SAD. Ondanks deze negatieve resultaten zijn nog genoeg aanwijzingen die aangeven dat Cpn infectie, een mogelijke trigger is van de initiatie van sporadische AD (28; 29).

1.4 Doel van de studie

Het mechanisme waardoor Cpn infectie AD kan induceren of verergeren nog niet gekend. In onze studie werd als hypothese gesteld dat Cpn infectie en de geassocieerde pro-inflammatoire stress via FPRL1 een effect heeft op de pathogenese van SAD. De vraagstelling van dit onderzoek was dan ook of er een verschil is in expressie en activiteit van FPRL1 na Cpn infectie. Er is aangetoond dat LPS de expressie van FPRL1 kan verhogen. Dit LPS is een onderdeel van het buitenste Cpn membraan. Het doel was dan ook de expressie van mFPR2 te meten na Cpn infectie door middel van real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Er is gebleken dat FPRL1 een tweezijdig effect heeft. Aan de ene kant is er sprake van een positief effect via de verwijdering van het toxische A β . Daarnaast vindt er ook een nadelig effect plaats via de vrijzetting van neurotoxische mediators en de verhoogde chemotaxis op microglia cellen. Tijdens deze studie zal de activiteit van FPRL1, dus in feite de A β -opname gemeten worden. Daarnaast zal de inflammatoire respons, met name het cytokine IL-6, bestudeerd worden die ontstaat na Cpn infectie en A β blootstelling. En tot slot zal de neurotoxiciteit van de geproduceerde cytokines geanalyseerd worden, dus de neuronale celdood die mogelijk optreedt na cytokine blootstelling.

2 Materiaal en Methoden

Tijdens deze stage werd de invloed van *Chlamydia pneumoniae* infectie op de opname van A β via de G-eiwit gekoppelde receptor FPRL1 onderzocht. Hierdoor zou eventueel een mechanisme ontrafeld kunnen worden hoe Cpn bijdraagt aan AD. Hiervoor werden MMC geïnfecteerd met Cpn, waarna er gekeken werd naar de expressie van mFPR2, de muishomoloog van FPRL1. De volgende stap was het blootstellen van Cpn-geïnfecteerde MMC aan A β . Hier werd nogmaals de expressie van mFPR bestudeerd. Op het bovenstaande medium werd een Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) uitgevoerd naar het cytokine IL-6. Tevens werd de invloed van de cytokines, geproduceerd na activatie van MMC door A β en/of Cpn, en de invloed van A β zelf op neuronale celdood bestudeerd.

2.1 Celkweek

Murine microgliacellen werden geschonken door Dr. M. Leinonen (Oulu, Finland). Deze cellijn werd gekweekt in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Gran Island, NY, USA) waaraan 10 % foetaal kalfserum (FCS), 1 M Hepes en 200 mM L-Glutamine werd toegevoegd. FCS en L-Glutamine voorzien het medium van groeifactoren en de pH van het medium werd geregeld door Hepes.

Murine neuroblasten werden gekweekt in Kaighn's modification of Ham's F12 medium (GIBCO, Gran Island, NY, USA) waaraan 15 % paardenserum en 2.5 % FCS werd toegevoegd.

De cellen groeiden in 75 cm² steriele kweekflessen (Greiner Bio-one, Frinckenhause, Duitsland) bij 37°C en 5 % CO₂ in een incubator. De cellen werden uitgesplitst over nieuwe kweekflessen om te vermijden dat de cellen over elkaar heen zouden groeien. De cellen werden hiervoor eerst gewassen met een fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS, Ca²⁺ en Mg²⁺ vrij) en vervolgens losgemaakt van mekaar en de bodem door middel van Trypsine EDTA (MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA), een serine protease dat eiwitten afbreekt. Vervolgens werd er kweekmedium toegevoegd en door FCS in dit kweekmedium werd het trypsine geïnactiveerd. Daarna werd de celsuspensie verdeeld over de nieuwe kweekflessen en aangevuld met vers medium.

2.2 Infectie van microgliacellen

De cellen werden gezaaid in 24-wells weefsel cultuurplaten (Corning Incorporated, NY, USA), met een densiteit van $2 \cdot 10^5$ cellen/well, voor het verkrijgen van een confluenta laag van cellen binnen de 24u. Hierna werden de cellen geïnfecteerd door het originele

cultuurmedium te vervangen door het infectiemedium, DMEM gesupplementeerd met 2% FCS, 1 M HEPES, 200 mM L-Glutamine en 0.031 μ g/ml cyclohexamide. Cyclohexamide is een inhibitor van de eiwitbiosynthese bij eukaryote organismen en verhoogt tevens de infectiviteit. Dit infectiemedium bevat Cpn met een multiplicity of infection (MOI) van 1 of een MOI van 5. De MMC werden ook blootgesteld aan Cpn, geïnactiveerd door UV-licht (in-Cpn), met een MOI van zowel 1 als 5. De blootgestelde MMC werden gedurende 1 uur geïncubeerd bij 4500 rotations per minute (rpm) en 20°C. Vervolgens werd het inoculum verwijderd en werden de cellen drie keer gewassen met PBS. Na deze wasstap werd infectiemedium zonder cyclohexamide en zonder Cpn of in-Cpn toegevoegd en werden de cellen gecultiveerd bij 37°C voor verschillende tijden. De negatieve controles ondergingen dezelfde procedures, waarbij Cpn en in-Cpn werd vervangen door een sucrose-fosfaat-glucose oplossing (SPG, de oplossing voor opslag van Cpn). Als positieve controles werden de cellen gestimuleerd met LPS (100ng/ml) voor dezelfde tijdstippen. Dit experiment werd in triplo uitgevoerd voor elke conditie.

2.3 Blootstelling aan Amyloid-beta₁₋₄₂

Er werd een stock van aangemaakt van 1 mM amyloid beta₁₋₄₂ peptide (California Peptide Research Inc., NAPA, California, USA), waarbij 5 mg A β ₁₋₄₂ opgelost werd in steriel MilliQ water totdat er een concentratie van 1mM verkregen werd. MMC werden 24u post-infectie (pi) blootgesteld aan 10 μ M A β ₁₋₄₂. Na 30 minuten en na 24u blootstelling werd het medium verzameld en werd vers infectiemedium zonder cyclohexamide toegevoegd.

2.4 Reverse transcriptase PCR

Het totale RNA werd verkregen uit de geïnfecteerde MMC na 24u, 48u en 72u, al dan niet vooraf behandeld met A β ₁₋₄₂, door het gebruik van TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Na DNase behandeling werd RNA omgezet in cDNA door het gebruik van de iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). Voor het kwantificeren van de hoeveelheid mFPR2 mRNA werd een PCR analyse uitgevoerd op het cDNA.

2.4.1 RNA isolatie

De geïnfecteerde MMC werden gelyseerd in 1 ml TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) door te vortexen. Na incubatie op kamertemperatuur werd 0.2 ml chloroform toegevoegd per 1 ml TRIZOL Reagent. Na menging via vortexen, werden de stalen

gecentrifugeerd bij 12.000 rpm gedurende 15 min bij 4°C. Centrifugatie zorgde voor een bifasische scheiding: de onderste rode fenolchloroform fase en een bovenste kleurloze waterige fase. Het RNA werd uit de waterige fase geprecipiteerd en gemengd met 0.5 ml isopropanol (per 1 ml TRIZOL Reagent). De stalen werden gedurende 10 min op ijs geïncubeerd en vervolgens gecentrifugeerd bij 12.000 rpm gedurende 10 min bij 4°C. Na verwijdering van het supernatant werd het RNA pellet een keer gewassen met 80% ethanol en vervolgens gedroogd bij 37°C. Tenslotte werd het pellet opgelost in NASBA behandeld water met 1 μ l RNA guard (Pharmacia, Freiburg, Duitsland).

2.4.2 DNase behandeling

De DNA inhoud werd geminimaliseerd door behandeling van het totale geëxtraheerde RNA met een mix van DNase I (Roche, Indianapolis, USA), MgCl₂, Tris/HCl (pH 7.5) en RNA guard (Pharmacia, Freiburg, Duitsland) voor 1u bij 37°C. Na de fenol extractie en ethanol precipitatie werd het pellet opgelost in NASBA water dat RNA guard (Pharmacia, Freiburg, Duitsland) bevat. Het RNA werd gekwantificeerd via een A₂₆₀ meting met behulp van de Nanodrop[®] ND-1000.

2.4.3 cDNA synthese

Het cDNA werd gesynthetiseerd door middel van iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). De reactie werd uitgevoerd met een totaal volume van 100%; bestaande uit 20% 5x iScript Reaction Mix, 5% iScript Reverse Transcriptase, 75% DNase behandeld RNA opgelost in NASBA water. De reacties, met een totaal voor 300 ng RNA, werden gedurende 5 min bij 5°C, 30 min bij 42°C en 5 min bij 85°C geïncubeerd.

2.4.4 Reverse transcriptase PCR

De PCR reacties werden uitgevoerd in een Bio-Rad Icyler toestel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). De reacties voor mFPR2 werden uitgevoerd met een totaal volume van 25 μ l, bestaande uit 50% IQ Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), 900nM forward primer (5'TGGTGGTTGTCTCCATCACTTT3') (Sigma Genosys, Londen, UK), 900nM reverse primer (5'GGAATCCAGCTACCCAGATCAC3') (Sigma Genosys, Londen, UK), 200nM probe (5'FAM-6GTCCATTGCCAGCACACCAAGGA0) (Sigma Genosys, Londen, UK), 20% NASBA water en 10% cDNA product. GAPDH, een huishoudgen, diende als interne controle, zodat de hoeveelheid RNA in de PCR reactie kon genormaliseerd worden. De reacties voor GAPDH

werden ook uitgevoerd met een totaal volume van 25 μ l, bestaande uit 50% IQ Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), 300nM forward primer (5'CATTGTGGAAGGGCTCATGA') (Sigma Genosys, Londen, UK) , 300nM reverse primer (5'GCCCCACGGCCATCA') (Sigma Genosys, Londen, UK), 200nM probe (5'FAM-6AGTCCATGCCATCACTGCCACCC0) (Sigma Genosys, Londen, UK), 22% NASBA water en 20% cDNA product. De condities voor amplificatie waren 2 min bij 50°C, 15 min bij 95°C en 42 cycli van 15 s bij 95°C en 1 min bij 60°C.

2.4.5 Data verwerking

De expressie van mFPR2 werd genormaliseerd aan de GAPDH hoeveelheden. De relatieve expressie, de ratio, van mFPR2 werd berekend op basis van de efficiëntie (E) en de Ct (Cycle Threshold) waarden van elke sample (y) versus mock (x) per tijdstip. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van volgende formule:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{mFPR2}^{x-y}}{E_{GAPDH}^{x-y}}$$

2.5 ELISA

Op verschillende tijdstippen na A β_{1-42} blootstelling (30 min en 24u) werd het medium van de verschillende condities verzameld. Voor een kwantificatie van de hoeveelheid IL-6 werd er gebruik gemaakt van een IL-6 Sandwich ELISA.

2.5.1 IL-6 sandwich ELISA

De ELISA plaat (Greiner, Frickenhausen, Duitsland) werd gecoat met 2.5 μ g/ml anti-muis IL-6 (Becton Dickinson Biosciences, Alphen aan den Rijn, Nederland) dat opgelost is in 0.1 M Na₂HPO₄ (pH 9.0). Na een overnacht incubatie bij 4°C werden de platen gewassen met PBS + 0.05% Tween. Gedurende 2u werd op kamertemperatuur PBS + 1% bovine serum albumine (BSA) geïncubeerd, zodat de niet-specifieke bindingsplaatsen geblokkeerd werden. Vervolgens werd de plaat driemaal gewassen met PBS + 0.05% Tween, waarna 100 μ l/well van het geconditioneerde medium toegevoegd werd, dat zo verdund werd dat het binnen het bereik van de standaardcurve viel. Hierna vond er een incubatie van 2u plaats bij kamertemperatuur. Na deze incubatieperiode werd de plaat viermaal gewassen met PBS + 0.05% Tween, gevolgd door een incubatie met 50 μ l/well detectie antilichaam (1 μ g/ml in PBS +1% BSA) (Becton Dickinson Biosciences, Alphen aan den Rijn, Nederland) gedurende 1u bij kamertemperatuur. Nadat de plaat viermaal gewassen werd met PBS + 0.05% Tween, werd 100 μ l/well Strept-HRP conjugaat (1:100

verdund in PBS + 1% BSA) (Dako Cytomation, Glostrup, Denemarken) toegevoegd en er werd 30 min geïncubeerd op kamertemperatuur. De plaat werd vervolgens vijfmaal gewassen met PBS + 0.05% Tween en hierna werd 100 μ l/well mix van substraat reagens A BD optEIA + substraat reagens B BD optEIA (Becton Dickinson Biosciences, Alphen aan den Rijn, Nederland) toegevoegd. Na 15 min incubatie op kamertemperatuur, werd 50 μ l/well H₂SO₄ toegevoegd, wat ervoor zorgt dat de kleurreactie stopte. De plaat werden geanalyseerd bij 450 nm. Het detectie limiet was 12.24 pg/ml.

2.6 Apoptose/necrose

Het verzamelde medium (30 min en 24u) werd eerst gefiltreerd via een 0.2 μ m filter (Schleicher and Schuell, Keene, NH), om alle infectieuze partikels te verwijderen. Dit gefilterde medium werd overgebracht naar een confluente monolaag neuronnen (densiteit $3 \cdot 10^5$ cellen/well) in 24-wellsplaten (Corning Incorporated, NY, USA). 72u later werd er geïncubeerd met Hoechst 33258 (HO) (Sigma, St. Louis, MO, USA) en met propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA). De stock oplossing van HO werd direct aan het verzamelde cultuurmedium toegevoegd, zo ontstond er een uiteindelijke concentratie van 1 μ g/ml, en er werd geïncubeerd voor 30 min bij kamertemperatuur. Na incubatie met HO vond de tegenkleuring plaats met PI met een uiteindelijke concentratie van 5 μ g/ml. De cellen werden in het donker geïncubeerd met PI voor 5 min bij kamertemperatuur. De cellen werden bestudeerd door middel van inverted fluorescentie microscoop. Levende, apoptotische en necrotische cellen werden geteld in 5 velden, met een vergroting van 400x, per well. Het gemiddelde percentage apoptotische/necrotische cellen werd bepaald voor 2 welletjes op verschillende tijdstippen pi. HO kan vrij diffunderen in levende cellen en zo de nucleï van deze cellen kleuren. Apoptotische cellen kunnen onderscheiden worden van de rest door de chromatine condensatie en nucleaire fragmentatie. PI daarentegen kan enkel cellen binnentreden met een beschadigd celmembraan en dus enkel necrotische en laat apoptotische cellen aankleuren.

2.7 Statistische analyse

SPSS 11.0 voor Windows werd gebruikt voor de statistische analyse van de verkregen resultaten. De student t-test werd toegepast om de gemiddelden van twee groepen te vergelijken. Een p-waarde ≤ 0.05 werd als statistisch significant beschouwd.

3 Resultaten

Allereerst werd het effect van *Chlamydia pneumoniae* blootstelling, zowel actief als inactief Cpn, op de expressie van mFPR2 in MMC bestudeerd. Vervolgens werd de expressie van mFPR2 onderzocht na Cpn (actief en inactief) blootstelling alsook A β ₁₋₄₂ blootstelling. Daarnaast werd de cytokine productie geanalyseerd, met name de productie van IL-6, na infectie met Cpn en/of blootstelling aan A β ₁₋₄₂. Tot slot werd de neurotoxiciteit van de geproduceerde cytokines onderzocht via een HO-PI dubbelkleuring.

3.1 Detectie van mFPR2 mRNA na *Chlamydia pneumoniae* infectie

Om het effect van Cpn op de expressie van mFPR2 te bestuderen, werden MMC blootgesteld aan LPS (100 ng), actief Cpn (MOI 1 en MOI 5) of aan inactief Cpn (MOI 1 en MOI 5) voor 24, 48 en 72u. Hierna werd er gebruik gemaakt van real-time PCR zodat een kwantitatieve meting verkregen werd van de veranderingen in de hoeveelheid mFPR2 mRNA. De relatieve eenheden geven het verschil in ratio weer ten opzichte van de mock-geïnfecteerde cellen (ratio = 1).

3.1.1 LPS stimuleert de expressie van mFPR2

MMC, voor 24, 48 en 72u blootgesteld aan 100 ng LPS, werden als positieve controle gebruikt. Op elk onderzocht tijdstip werd de expressie van mFPR2, na LPS stimulatie, significant verhoogd vergeleken met de mFPR2 expressie in controle cellen. Het maximale effect van LPS op de receptor expressie werd verkregen na een 24u durende incubatie (Fig 3A). Hieruit konden we concluderen dat de proefopzet werkte en dat op deze manier verschillen in expressie gemeten konden worden.

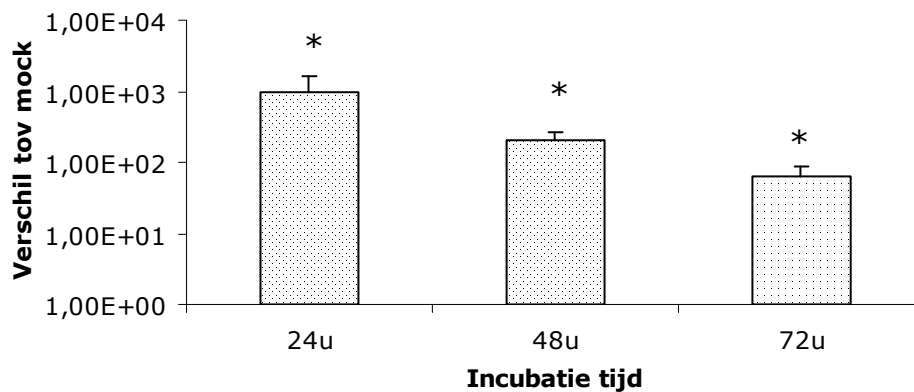
3.1.2 Invloed van Cpn infectie op de expressie van mFPR2

Wanneer MMC geïnfecteerd werden met Cpn (MOI 1), daalde de expressie van mFPR2 op elk onderzocht tijdstip (Fig 3B). 48u na infectie met Cpn, werd de expressie van mFPR2 significant verlaagd vergeleken met de expressie in mock-geïnfecteerde cellen. Infectie van MMC met Cpn (MOI 5), zowel 24, 48 als 72u pi, leidde echter tot een verhoging van de receptorexpressie. Deze veranderingen waren echter niet significant vergeleken met de expressie in mock-geïnfecteerde cellen. Deze resultaten suggereren dat blootstelling van MMC aan actief Cpn (MOI 1) leidt tot een daling in de expressie van mFPR2. Blootstelling van MMC aan actief Cpn (MOI 5) daarentegen leidt tot een verhoging in de expressie van mFPR2.

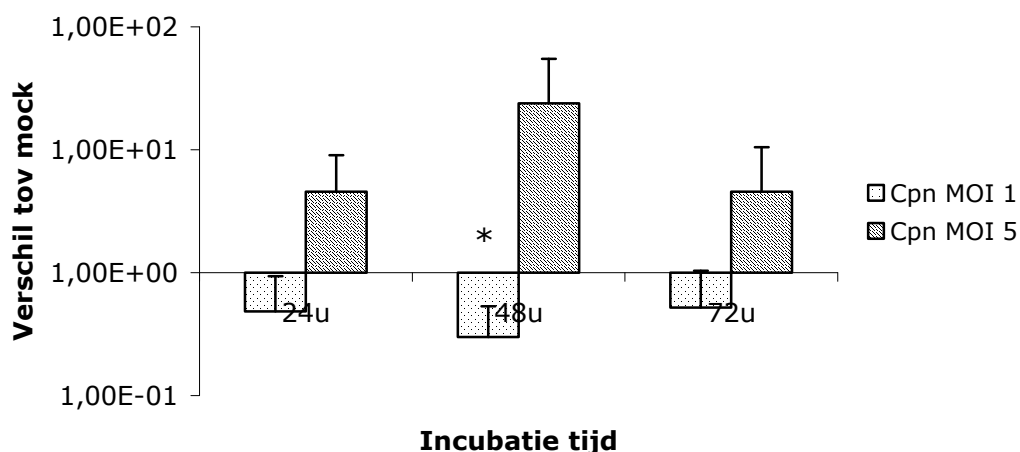
3.1.3 Invloed van blootstelling aan inactief Cpn op de expressie van mFPR2

Zoals weergegeven in figuur 3C werd de expressie van mFPR2 in MMC na blootstelling aan in-Cpn (MOI 1 en MOI 5) op elk onderzocht tijdstip verhoogd. De hoeveelheid mFPR2 mRNA was 24u pi ongeveer honderd keer meer vergeleken met de hoeveelheid mFPR2 mRNA in mock-geïnfecteerde cellen. Er kon enkel 48u na blootstelling aan in-Cpn (MOI 1) een significant verschil gedetecteerd worden. 24u pi, is de hoeveelheid mFPR2 mRNA na in-Cpn (MOI 5) blootstelling ongeveer tien keer zoveel als de hoeveelheid mFPR2 mRNA dat gedetecteerd wordt na Cpn (MOI 5) blootstelling (Fig 3B en 3C). Dus deze data tonen aan dat inactief Cpn (MOI 1 en MOI 5) leidt tot een verhoging in de hoeveelheid mFPR2 mRNA.

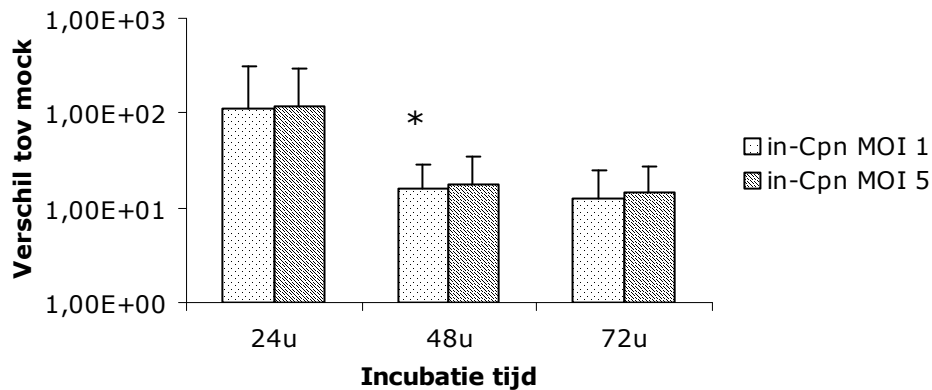
A. LPS



B. Actief Cpn



C. Inactief Cpn



Figuur 3. Relatieve mFPR2 mRNA expressie na Cpn infectie. MMC werden geïncubeerd met 100 ng LPS (A), blootgesteld aan actief Cpn (B) of aan inactief Cpn (C) voor 24, 48 en 72u. Uit deze cellen werd het totale RNA geïsoleerd en dit RNA werd gebruikt om de hoeveelheid mFPR2 mRNA te bestuderen via RT-PCR. De relatieve eenheden, berekend zoals beschreven in materiaal en methoden, geven het verschil weer ten opzichte van de mock (ratio = 1). De data worden weergegeven als het gemiddelde \pm de standaardfout van 4 trails die in triplo zijn uitgevoerd. * $p \leq 0.05$ mock vs blootgesteld.

3.2 Detectie van mFPR2 mRNA na *Chlamydia pneumoniae* infectie en $A\beta_{1-42}$ blootstelling

Om het effect van Cpn infectie op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling te onderzoeken, werden MMC eerst blootgesteld aan LPS, actief Cpn of inactief Cpn. Er werd geopteerd om de cellen bloot te stellen aan actief en inactief Cpn met een MOI 5, omdat deze een meer uitgesproken verschil in receptor expressie gaven vergeleken met respectievelijk Cpn en in-Cpn met een MOI 1 (Fig 3). 24u post infectie werd 10 μ M $A\beta_{1-42}$ direct aan het cultuurmedium toegevoegd. Na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling en 24u $A\beta_{1-42}$ blootstelling werd het totale RNA geïsoleerd en hierop werd een RT-PCR uitgevoerd om de expressie van mFPR2 te kwantificeren. De relatieve eenheden geven het verschil in ratio weer ten opzichte van de mock-geïnfecteerde cellen (ratio = 1).

3.2.1 Effect van LPS op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling

Figuur 4A toont aan dat wanneer mock-geïnfecteerde cellen blootgesteld worden aan $A\beta_{1-42}$ er op beide tijdstippen een verhoging in de hoeveelheid mFPR2 mRNA detecteerbaar is. Worden deze cellen vooraf gestimuleerd met LPS, dan leidt tot een uitgesproken verhoging in de hoeveelheid mFPR2 mRNA. De gedetecteerde verschillen waren echter niet significant. Deze data geven aan dat de hoeveelheid mFPR2 mRNA beduidende

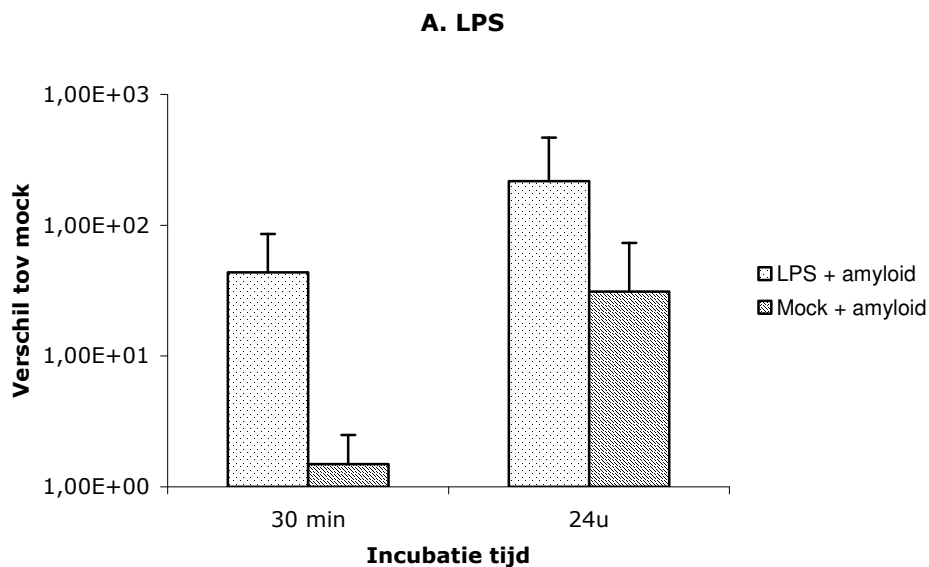
verhoogd kan worden door mock-geïnfecteerde MMC gedurende 24u bloot te stellen aan $A\beta_{1-42}$. Als deze cellen vooraf gestimuleerd worden met LPS zal dit leiden tot een meer uitgesproken verhoging in de hoeveelheid mFPR2 mRNA.

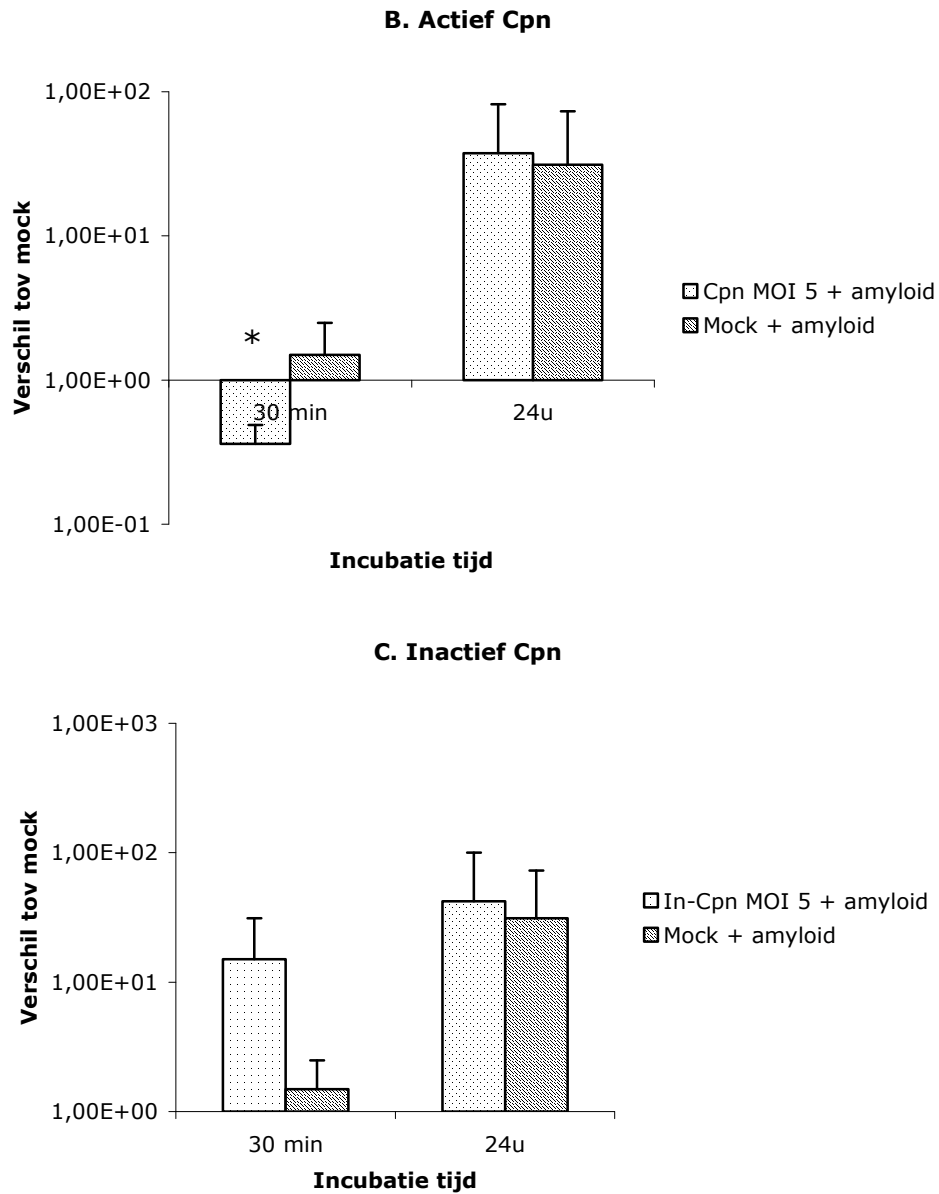
3.2.2 Effect van Cpn op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling

Infectie met Cpn zorgde voor een significante verlaging in mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling (30 min) vergeleken met de expressie in mock-geïnfecteerde cellen. Dit in tegenstelling tot een 24u durende incubatie met $A\beta_{1-42}$, wat leidde tot een verhoging in mFPR2 expressie (Fig 4B). Dus voorbehandeling met Cpn heeft een minimaal effect op de expressie van mFPR2 na een 24u durende incubatie met $A\beta_{1-42}$.

3.2.3 Effect van in-Cpn op mFPR2 expressie na $A\beta_{1-42}$ blootstelling

Zoals weergegeven in figuur 4C is de hoeveelheid mFPR2 mRNA in cellen die vooraf behandeld werden met in-Cpn en daarna gedurende 30 min blootgesteld worden aan $A\beta_{1-42}$ beduidend meer vergeleken met de mock-geïnfecteerde cellen. Na een 24u durende $A\beta_{1-42}$ incubatie is het verschil in mFPR2 mRNA tussen mock-geïnfecteerde en in-Cpn voorbehandelde cellen niet meer zo uitgesproken. Voorbehandeling met in-Cpn heeft zijn grootste effect op de expressie van mFPR2 na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling.





Figuur 4. Relatieve mFPR2 mRNA expressie na Cpn infectie en $A\beta_{1-42}$ blootstelling. MMC werden geïncubeerd met 100 ng LPS (A), blootgesteld aan actief Cpn (B) of inactief Cpn (C) voor 24u. Hierna werden de cellen voor 30 minuten of 24u blootgesteld aan 10 μ M $A\beta_{1-42}$. Uit deze cellen werd het totale RNA geïsoleerd en dit RNA werd gebruikt om de expressie van mFPR2 te bestuderen via RT-PCR. De relatieve eenheden, berekend zoals beschreven in materiaal en methoden, geven het verschil weer ten opzichte van de mock conditie (ratio = 1). De data worden weergegeven als het gemiddelde \pm de standaardfout van 2 trails die in triplo zijn uitgevoerd. * $p \leq 0.05$ mock vs blootgesteld.

3.3 Inductie van IL-6 expressie

Eerdere studies hebben aangetoond dat Cpn infectie van MMC resulteert in een significante verhoging van verschillende inflammatoire cytokines, waaronder IL-6. Naast het effect van Cpn infectie op de cytokine productie, kan $A\beta_{1-42}$ ook zelf de cytokine productie in MMC cellen induceren.

Het vermogen van Cpn infectie en $A\beta_{1-42}$ om de productie van het pro-inflammatoire cytokine IL-6 te induceren werd in volgend experiment onderzocht. Hiervoor werden MMC blootgesteld aan actief Cpn, inactief Cpn en een mock conditie. 24u pi werd er 10 μ M $A\beta_{1-42}$ toegevoegd aan het medium, dit medium werd 30 minuten en 24u na toevoeging van $A\beta_{1-42}$ verzameld. Op het verzamelde medium werd een sandwich ELISA uitgevoerd naar het pro-inflammatoire cytokine IL-6. De concentratie IL-6 bleef bij de mock-geïnfekteerde cellen zonder $A\beta_{1-42}$ onder het detectie limiet.

3.3.1 Inductie van IL-6 productie na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling

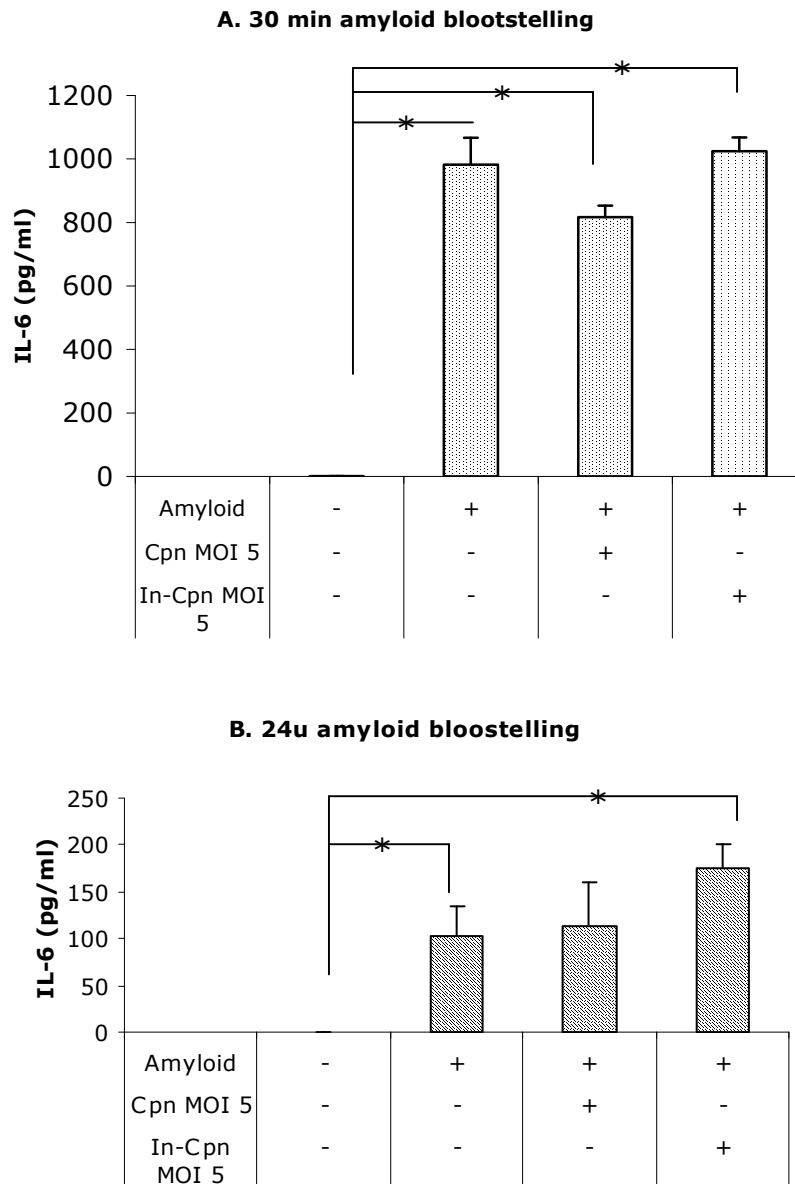
Figuur 5A geeft duidelijk weer dat 30 min $A\beta_{1-42}$ blootstelling al voldoende is voor een uitgesproken stijging in de productie van het pro-inflammatoire cytokine IL-6. Wanneer MMC voorbehandeld zijn met in-Cpn of Cpn voor 24u en daarna 30 min blootgesteld worden aan $A\beta_{1-42}$, leidt dit tot een significante verhoging van de IL-6 productie vergeleken met de mock-geïnfekteerde cellen zonder $A\beta_{1-42}$. De concentratie IL-6 in het supernatans van Cpn-geïnfekteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling vertoonde een lichte daling vergeleken met concentratie IL-6 bepaald in het supernatans van de mock-geïnfekteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling. De hoeveelheid IL-6 in het supernatans van MMC voorbehandeld met in-Cpn en blootgesteld aan $A\beta_{1-42}$ nam lichtjes toe vergeleken met de concentratie IL-6 in het supernatans van mock-geïnfekteerde cellen blootgesteld aan $A\beta_{1-42}$.

3.3.2 Inductie van IL-6 productie na 24u $A\beta_{1-42}$ blootstelling

Wanneer MMC gedurende 24u geïncubeerd worden met $A\beta_{1-42}$ (Fig 5B), is de toename in IL-6 productie niet meer zo uitgesproken vergeleken met een 30 min durende incubatie met $A\beta_{1-42}$ (Fig 5A). De hoeveelheid IL-6 in het supernatans van mock-geïnfekteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling ligt significant hoger dan de hoeveelheid IL-6 in het supernatans van mock-geïnfekteerde cellen zonder $A\beta_{1-42}$. Voorbehandeling van de cellen met in-Cpn zorgt voor een lichte toename in de IL-6 concentratie, vergeleken met de concentratie IL-6 in het supernatans van de mock-geïnfekteerde cellen met $A\beta_{1-42}$. Voorbehandeling met Cpn veroorzaakte een minimale toename in de concentratie IL-6,

vergeleken met de hoeveelheid IL-6 in het supernatans van mock-geïnfecteerde cellen met $A\beta_{1-42}$.

Deze data tonen aan dat de productie van IL-6 piekte na een incubatie van 30 min met $A\beta_{1-42}$. Voorbehandeling van deze cellen met Cpn leidde tot een lichte daling in de concentratie IL-6. Voorbehandeling van deze cellen met in-Cpn veroorzaakte een lichte toename in de concentratie IL-6. Voorbehandeling van MMC met zowel Cpn als, meer uitgesproken, in-Cpn gevolgd door een 24u durende $A\beta_{1-42}$ incubatie, kan de IL-6 productie lichtjes verhogen.



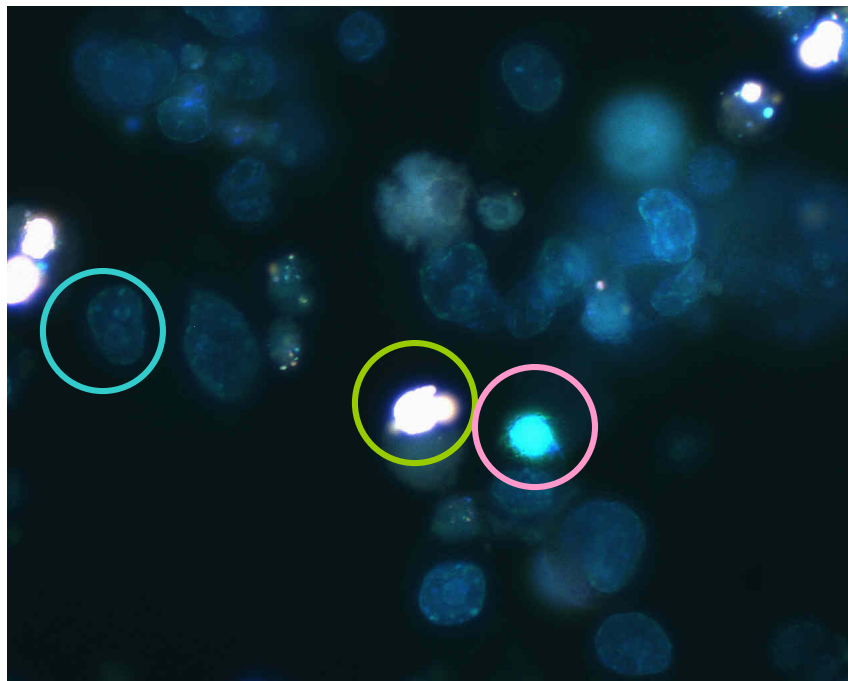
Figuur 5. Inductie van de IL-6 productie door $A\beta_{1-42}$ en *Chlamydia pneumoniae*. MMC werden gezaaid met een densiteit van 2.10^5 , waarna ze blootgesteld werden aan Cpn, inactief Cpn en SPG (mock). 24u later werd $10 \mu M$ $A\beta_{1-42}$ toegevoegd aan het medium. Na een 30 minuten durende incubatie (A) en een 24u durende incubatie (B) met $A\beta_{1-42}$ werd het medium verzameld. Op de medium werd een ELISA uitgevoerd naar het cytokine IL-6. De concentratie IL-6 in het medium van mock-geïnfecteerde cellen (zonder $A\beta_{1-42}$) bleef onder de detectie grens. De data worden weergegeven als het gemiddelde \pm de standaardfout, $n=2$, * $p \leq 0.05$ mock vs blootgesteld

3.4 Neurotoxisch effect van de geproduceerde cytokines en A β_{1-42}

Om te onderzoeken of de cytokines, geproduceerd als reactie op Cpn infectie en/of A β_{1-42} blootstelling, neuronale celdood kunnen induceren, werd het samples van Cpn-geïnfecteerde cellen eerst gefiltreerd om de resterende Cpn deeltjes uit het supernatans te verwijderen. Dit geconditioneerde supernatans werd overgebracht naar een neuronale monolaag om de daaropvolgende apoptose/necrose te bestuderen, door middel van een HO-PI dubbelkleuring.

Het intacte membraan van levende cellen is niet permeabel voor de PI kleurstof. Door de uitgebreide membraanschade, die ontstaat door necrose, worden necrotische cellen vlug aangekleurd door incubatie met PI en onder UV-licht zullen deze cellen dan ook een rode kleur uitstralen. De apoptotische cellen vertonen een hoge HO kleuring, hierdoor zullen ze een heldere blauwe kleur, soms bijna wit, uitstralen bij UV bestraling. De gezonde cellen vertonen door het HO een vaag blauwe kleur (Fig 6).

Zowel gezonde, apoptotische als necrotische cellen werden geteld op verschillende tijdstippen na toevoeging van A β_{1-42} en de resultaten zijn weergegeven als het percentage apoptotische en necrotische cellen.



Figuur 6. Voorbeeld van neuronen aangekleurd met HO-PI . Gezonde cellen worden gekenmerkt door een vage blauwe kleur (blauwe cirkel). Apoptotische cellen vertonen een helder blauwe kleur, soms bijna wit (roze cirkel). Necrotische cellen daarentegen worden aangekleurd door PI en dit leidt tot een rode kleur onder UV bestraling (groene cirkel). Vergroting: 400x.

3.4.1 Apoptose en necrose na 30 minuten $A\beta_{1-42}$ blootstelling

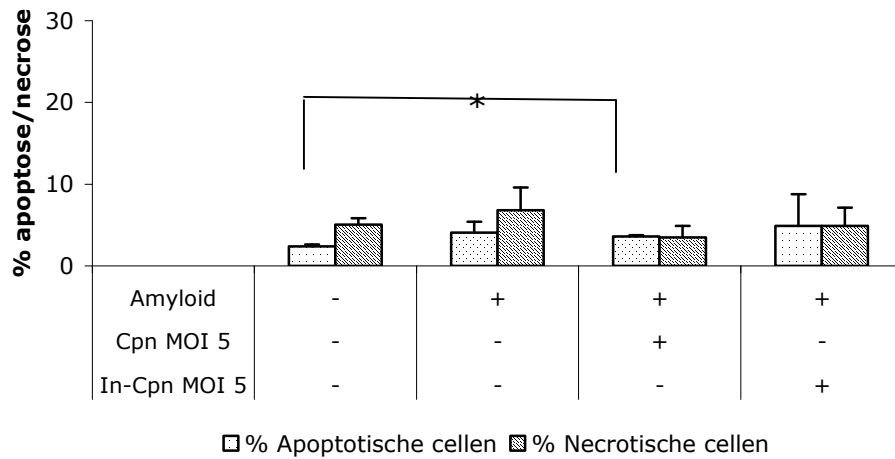
Zoals weergegeven in figuur 7A werden er geen significante verschillen in zowel apoptotische als necrotische neuronale celdood gedetecteerd wanneer neuronale cellen geïncubeerd werden met supernatans van mock-geïnfecteerde of in-Cpn blootgestelde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling (30 min). Echter, wanneer het supernatans van Cpn-geïnfecteerde MMC met $A\beta_{1-42}$ blootstelling (30 min) overgebracht werd, nam het percentage apoptotische cellen significant toe, vergeleken met het percentage apoptotische celdood, gedetecteerd na blootstelling van de neuronen aan het supernatans van mock-geïnfecteerde MMC zonder $A\beta_{1-42}$ blootstelling.

3.4.2 Apoptose en necrose na 24u $A\beta_{1-42}$ blootstelling

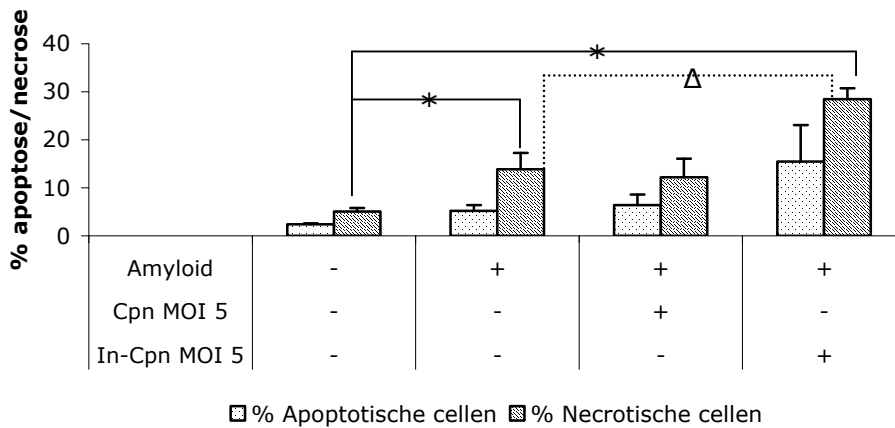
Wanneer MMC gedurende 24u geïncubeerd worden met $A\beta_{1-42}$, zijn er uitgesproken verschillen merkbaar in het percentage apoptotische en necrotische neuronale cellen tussen de verschillende condities (Fig 7B). Incubatie van neuronale cellen met het supernatans van mock-geïnfecteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling, veroorzaakte een significante toename in het percentage necrotische neuronale cellen vergeleken met de necrotische celdood die optrad na blootstelling aan het supernatans van mock-geïnfecteerde cellen zonder $A\beta_{1-42}$ blootstelling. Transfer van het supernatans van MMC voorbehandeld met in-Cpn met de daaropvolgende $A\beta_{1-42}$ blootstelling, veroorzaakte een uitgesproken toename in zowel het percentage apoptotische als necrotische (significant) cellen vergeleken met het percentage celdood dat ontstond na transfer van het supernatans mock-geïnfecteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling. Het percentage neuronale celdood dat optreedt na transfer van het supernatans van Cpn-geïnfecteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling, verschilt weinig van het percentage neuronale celdood dat gedetecteerd wordt na overdracht van het supernatans van mock-geïnfecteerde cellen met $A\beta_{1-42}$ blootstelling naar neuronale cellen.

De experimentele bevindingen tonen aan dat er een uitgesproken significante stijging in celdood optreedt, wanneer neuronen geïncubeerd worden met het supernatans van mock-geïnfecteerde MMC die gedurende 24u geïncubeerd werden met $A\beta_{1-42}$. Voorbehandeling van deze MMC met in-Cpn, maar niet met actief Cpn, en de daaropvolgende transfer van het supernatans naar neuronale cellen, leidt op zijn beurt tot beduidend meer neuronale celdood.

A. 30 min amyloid blootstelling



B. 24u amyloid blootstelling



Figuur 7. Neurotoxisch effect van de geproduceerde cytokines en $A\beta_{1-42}$. Apoptose en necrose van neuronen werd bepaald door gebruik te maken van een HO-PI dubbelkleuring, nadat het geconditioneerde supernatans van de verschillende condities overgebracht werd. De data worden weergegeven als de gemiddelde percentages \pm de standaardfout, $n = 2$, $*p \leq 0.05$ mock vs blootgesteld apoptotische/necrotische cellen per tijdstip. $\Delta p \leq 0.05$ mock + $A\beta_{1-42}$ vs in-Cpn + $A\beta_{1-42}$ apoptotische/necrotische cellen per tijdstip

4 Discussie

Klinische trials en post-hoc studies suggereren dat inflammatie een actieve rol speelt in de ontwikkeling en progressie van AD. Een mogelijke manier waarop deze inflammatie kan ontstaan is via de activatie van microgliacellen door $A\beta_{42}$. Door de activatie worden er moleculen gesynthetiseerd en gesecreteerd die toxisch zijn voor neuronen (15). Recent werd aangetoond dat er een associatie bestaat tussen Cpn infectie en SAD. Deze chlamydiale infectie kan een inflammatoire respons veroorzaken via een verhoging van de cytokine productie van geïnfecteerde en naburige cellen. Het initiëren van deze reactie kan gebeuren op verschillende manieren, waaronder directe infectie, LPS stimulatie en/of productie van heat shock proteïnen (26). Toch is een eenduidig mechanisme waardoor Cpn infectie AD kan induceren of verergeren nog niet gekend. In de literatuur werd gesuggereerd dat FPRL1 belangrijk is voor de opname en degradatie van $A\beta_{42}$. Niet-gestimuleerde muis microgliacellen brengen weinig mFPR2, de FPRL1 muishomoloog, tot expressie. De expressie van mFPR2 wordt in muis microgliacellen geregeld door pro-inflammatoire stimuli, zoals LPS en TNF- α . Activatie van microgliacellen door LPS, een onderdeel van het buitenste Cpn membraan, zorgde voor een merkbare stijging in mFPR2 expressie. Dit gegeven suggereert dat microbiële infectie, via de verhoging van de mFPR2 expressie in microgliacellen, een uitgesproken effect heeft op de pathogenese van AD (5).

In onze studie vertoonden de mock-geïnfecteerde cellen weinig mFPR2 expressie, wat in overeenstemming is met eerdere gegevens. Wanneer muis microgliacellen gestimuleerd werden met LPS, werd de expressie van mFPR2 significant verhoogd. Een grote toename in receptorexpressie was zichtbaar 24u na blootstelling aan LPS. Dit komt overeen met de resultaten van Cui et al (19), ook daar werd het maximale effect van LPS op de genexpressie van de receptor verkregen na een incubatie periode van 24u. Dus microgliacellen, die reageren op LPS, worden geactiveerd en verhogen de mFPR2 functie. Deze verhoging kan hun accumulatie op plaatsen met een verhoogde productie van $A\beta_{1-42}$ vergemakkelijken. Of dit leidt tot een betere klaring van het toxische $A\beta_{1-42}$ of dit proces de ziekte verergert door inflammatie te stimuleren is nog onbekend (19). Voor zover we weten zijn er nog geen data beschikbaar over het mogelijke effect van Cpn infectie op de expressie van mFPR2. Er werd verondersteld dat Cpn als Gram-negatieve bacterie met LPS in het buitenste membraan ook een stijging in de receptorexpressie zou veroorzaken. Onze resultaten doen vermoeden dat actief Cpn kan zorgen voor een daling in de receptorexpressie. Eerder onderzoek toonde aan MMC, geïnfecteerd met Cpn, significante hoeveelheden IL-10, een anti-inflammatoir cytokine, kunnen produceren (31). Szczepanik et al (32) hebben onderzocht of verscheidende anti-inflammatoire

cytokines (IL-4, IL-10 en IL-13) in staat zijn de activatie van microgliacellen door A β en door LPS te onderdrukken. Zij toonden aan dat de inductie van pro-inflammatoire cytokines, een gevolg van microgliacel activatie, door A β of door LPS geïnhibeerd werd door IL-10. Recent is er aangetoond dat IL-4, een anti-inflammatoir cytokine, de expressie van mFPR2 kan inhiberen in MMC die geactiveerd zijn door TNF- α (18). Mogelijk kan de activatie van microgliacellen geïnhibeerd worden door cytokines die vrijkomen als reactie op Cpn infectie. Om hierover eenduidigheid te krijgen moet er verder onderzoek gedaan worden naar de modulerende effecten van deze cytokines. Blootstelling van de cellen aan in-Cpn leidde tot duidelijke verhoging in de hoeveelheid mFPR2 mRNA. De geziene verhoging in mFPR2 expressie is vergelijkbaar met de hoeveelheid mFPR2 mRNA gedetecteerd in LPS-gestimuleerde cellen. Eerder onderzoek toonde aan dat UV-bestraling van Cpn de membraanstructuur of de conformatie van oppervlakte moleculen kan verstoren. Hierdoor kan de Cpn minder cytokine responsen uitlokken bij microgliacellen (33), waardoor mogelijk het effect van het LPS in de celwand primeert als stimulus voor activatie van microgliacellen. Verder onderzoek is nodig om te bepalen of Cpn infectie en in-Cpn blootstelling van MMC een effect heeft op de werking van de receptor. De hoeveelheid mFPR2 mRNA weerspiegelt niet noodzakelijk het aantal functionele receptoren, daarom is het nuttig de opname van A β_{1-42} te bestuderen, door middel van een ELISA specifiek voor A β_{1-42} of via immunohistochemische kleuringen.

FPRL1 is geïdentificeerd als een functionele receptor voor A β_{1-42} . Onderzoek toonde aan dat de capaciteit van microgliacellen om A β_{42} op te nemen en te verwijderen bepaald wordt door de hoeveelheid A β_{42} dat geproduceerd wordt en ook door de duur van de blootstelling. Deze stelling baseert zich op het onderzoek van Yawaza et al (7), waar werd aangetoond dat wanneer A β_{42} , na 30 minuten incubatie, uit het cultuurmedium van macrofagen verwijderd wordt, er in een snelle recycling van FPRL1 naar het celoppervlak plaatsvindt. Alhoewel na 24u A β_{42} nog intracellulair gedetecteerd kon worden, was men 48u later niet meer in staat A β_{42} te detecteren. Dit suggereert dat A β_{42} gedegradeerd was. Kinetische studies, geanalyseerd door middel van confocale microscopie, toonden aan dat na 5 min A β_{42} blootstelling, A β_{42} en FPRL1 gecolocaliseerd zijn op het celoppervlak, waarna een snelle en progressieve internalisatie van het A β_{42} /FPRL1 complex plaatsvond. Nadat het A β_{42} verwijderd is, gaat de receptor snel terug naar het celoppervlak (7). In onze studie voerden we een kwantitatieve meting op mRNA niveau uit naar de expressie van FPRL1. Wanneer de mock-geïnfekteerde cellen voor 24u geïncubeerd werden met 10 μ M A β_{42} was er een significante verhoging van de receptorexpressie waarneembaar vergeleken met de mock-geïnfekteerde cellen zonder A β_{42} . Dus A β_{42} activeert microgliacellen door middel van een stijging in FPRL1 expressie, dit kan mogelijk door de oppervlakte expressie van intracellulaire bestaande mFPR2 pools

te stimuleren. In tegenstelling tot eerder verkregen resultaat, leidde voorbehandeling van microgliacellen met Cpn en de daaropvolgende $A\beta_{1-42}$ blootstelling (24u) tot een toename in receptorexpressie, deze toename kan mogelijk gemedieerd zijn door $A\beta_{1-42}$. De resultaten van Yawaza kunnen moeilijk vergeleken worden met de resultaten uit onze studie, aangezien mFPR2 in onze studie gekarakteriseerd werd op mRNA niveau, terwijl Yawaza mFPR2 bestudeerde op eiwitniveau.

Alhoewel de opname van $A\beta_{42}$ door microgliacellen mogelijk een verdedigingsreactie tegen het pathogene $A\beta_{42}$ is, is interactie van $A\beta_{42}$ met FPRL1 en de resulterende internalisatie duidelijk geassocieerd met een pro-inflammatoire respons (7). Als reactie op $A\beta_{42}$, secreteren microgliacellen complementeiwitten, inflammatoire cytokines en chemokines. Daarnaast zullen microgliacellen ook neurotoxische stoffen produceren. De studie van Szczepanik et al (32) bevestigt eerdere bevindingen, namelijk dat microgliacellen in staat zijn te reageren op $A\beta_{42}$ en LPS via de productie van IL-1 β , TNF- α en MCP-1. Daarnaast toonde hun studie aan dat microgliacellen ook IL-1 α en IL-6 produceren als reactie op $A\beta_{1-42}$. Vele studies suggereren dat de vrijzetting van pro-inflammatoire cytokines door microgliacellen, als reactie op $A\beta_{1-42}$ blootstelling, kan resulteren in neuronale celdood en progressie of zelf initiatie van AD. Daarnaast zorgt Cpn infectie van microgliacellen ook voor een uitgesproken productie van verschillende cytokines, waaronder IL-6, IL-1 β en TNF- α (31). In lijn met deze data, werd er in onze studie aangetoond dat, in het supernatans van mock-geïnfekteerde microgliacellen, voor 30 min blootgesteld aan 10 μ M $A\beta_{1-42}$, significante hoeveelheden IL-6 gevonden werd. Wanneer deze cellen vooraf blootgesteld werden aan zowel actief als inactief Cpn, nam de concentratie IL-6 zichtbaar toe.

De oorzaak van het neuronale verlies, gezien bij AD patiënten, is nog niet volledig bekend. Er zijn suggesties dat het $A\beta_{42}$ proteïne direct neurotoxisch is en dat de omringende microgliacellen en astrocyten een belangrijke rol spelen in de inflammatoire respons. Studies toonden aan dat $A\beta_{42}$ stimulatie van microgliacellen resulteert in de productie van vele pro-inflammatoire moleculen. Tevens zijn er ook vele onderzoeken die rapporteren dat $A\beta_{42}$ -gestimuleerde microgliacellen ook anti-inflammatoire cytokines produceren. Dus, al deze studies geven de complexiteit van de situatie weer. Bij AD kunnen de pro-inflammatoire cytokines eventueel leiden tot degeneratie van neuronen die gelokaliseerd zijn rond de plaques (9). Naast het effect van de cytokines, geproduceerd als reactie op $A\beta_{42}$, is er recent aangetoond dat incubatie van neuronen met supernatans van Cpn-geïnfekteerde microgliacellen, leidde tot een verhoogd percentage neuronale cellen die necrose en, in mindere mate, apoptose ondergingen. Wanneer IL-6 en TNF- α geneutraliseerd werden, werd de celdood met ongeveer 50 %

verlaagd. Dus deze geproduceerde cytokines zijn in grote mate verantwoordelijk voor de geobserveerde neuronale celdood (31). Tijdens dit onderzoek werd de neuronale celdood geanalyseerd die optrad na blootstelling aan de cytokines, vrijgezet door microgliacellen als reactie op Cpn en $A\beta_{1-42}$. Incubatie van neuronen met het geconditioneerde supernatans van mock-geïnfekteerde cellen die blootgesteld werden aan $A\beta_{1-42}$ (24u), had als gevolg dat het percentage neuronale cellen die necrose ondergingen significante verhoogd werd. Wanneer het geconditioneerde supernatans, van microgliacellen blootgesteld aan in-Cpn en $A\beta_{1-42}$, overgebracht werd naar een neuronale cellaag, was er een significante toename in zowel het percentage apoptische als, meer uitgesproken, het percentage necrotische cellen.

Deze data tonen aan dat $A\beta_{1-42}$ in staat is de productie van cytokines door microgliacellen te induceren, mogelijk via mFPR2. Deze pro-inflammatoire cytokines, alsook $A\beta_{1-42}$ zelf kunnen een neurotoxisch milieu creëren met neuronale celdood als gevolg. Cpn kan de expressie van mFPR2 verlagen, wat tot minder activatie van microgliacellen kan leiden. Door deze verminderde activatie zullen de neurotoxische effecten voornamelijk door $A\beta_{1-42}$ veroorzaakt worden. Inactief Cpn daarentegen kan leiden tot meer activatie van microgliacellen, waardoor deze meer pro-inflammatoire cytokines zullen vrijzetten. Deze cytokines, als gevolg van de microgliacel activatie via mFPR2, zullen toxisch zijn voor de omliggende neuronen. Deze data suggereren een lage hoeveelheid Cpn, via een daling in mFPR2 expressie, de progressie in AD kan verergeren door de directe toxische effecten van $A\beta_{1-42}$ te moduleren. Anderzijds kunnen cellulaire componenten van Cpn additioneel bijdragen aan neurodegeneratie door een verhoging van mFPR2 expressie en alzo de productie van pro-inflammatoire cytokines na $A\beta$ blootstelling verhogen.

Verder onderzoek is nodig om het mechanisme waardoor Cpn infectie AD kan induceren of verergeren volledig te analyseren. Ook is het nodig om een duidelijk beeld te krijgen van de voordelige versus de nadelige effecten van FPRL1/mFPR2 na *Chlamydia pneumoniae* infectie gedurende de pathogenese van AD. De receptorexpressie werd ook enkel getest om mRNA niveau, het kan nuttig zijn om te onderzoeken of er ook verschillen zijn in eiwitexpressie van de receptor. Mogelijk kunnen door externe factoren post-translationele modificaties optreden, met mogelijke functie en/of conformatie veranderingen tot gevolg. Daarnaast kan $A\beta_{42}$ ook door andere receptoren opgenomen worden, om duidelijkheid te krijgen over de impact van FPRL1, zal FPRL1/mFPR2 uitgeschakeld moeten worden via bijvoorbeeld siRNA. *In vivo* kan men de rol van deze receptor verder verhelderen door muizen te gebruiken waarin deze receptor uitgeschakeld is. Deze mFPR2 KO muizen kunnen gekruist worden met een transgeen APP muismodel voor AD, die het inflammatie aspect van de ziekte vertoont.

Referenties

1. Bondolfi LE. Neurodegeneration and neurogenesis in mouse models of aging and Alzheimer's disease. Proefschrift, Basel; 2003.
2. Streit WJ. Review: Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. J. Neurosci. Res 2004; 77: 1-8.
3. Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM. *Chlamydia pneumoniae* induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. Neurobiol Aging 2004; 25: 419-429.
4. Burns DK, Kumar V. The nervous system. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 7th edition. Philadelphia (Pennsylvania): Saunders; 2003. p. 809-851.
5. Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid β peptide. J. Biol. Chem 2006; 281: 3651-3659.
6. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. β -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. Neuron 1995; 14: 879-888.
7. Yawaza H, Yu Z, Takeda K, Le Y, Gong W, Ferrans VJ, et al. β amyloid peptide ($A\beta_{42}$) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. FASEB J 2001; 15: 2454-2462.
8. St George-Hyslop PH. Review: Molecular genetics of Alzheimer disease. Biol psychiatry 2000; 47: 183-199.
9. Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi KI. Role of toll-like receptor signalling in $A\beta$ uptake and clearance. Brain 2006; 129: 3006-3019.
10. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J Neurosci 1992; 12: 376-389.
11. Furukawa K, Mattson MP. Cytochalasins protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence that actin depolymerization suppresses Ca^{2+} influx. J Neuro-chem 1995; 65; 1061-1068.
12. Small DH, McLean CA. Alzheimer's disease and the amyloid β protein: what is the role of amyloid? J. Neurochem 1999; 73: 443-449.
13. Guela C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain to amyloid- β protein neurotoxicity. Nature Medicine 1998; 4: 827-831.
14. Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, Dority MD, Embury PB, et al. Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. J Neurochem 2000; 74: 1017-1025.

15. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. Amyloid- β peptide activates cultured astrocytes: morphological alternations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 1998; 785: 195-206.
16. Kielan T. Review: Toll-like receptors in central nervous system, glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 2006; 83: 711-730.
17. Cui YH, Le Y, Yazawa H, Gong W, Wang JM. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 628-635.
18. Iribarren P, Chen K, Hu J, Zhang X, Gong W, Wang JM. IL-4 inhibits the expression of mouse formyl peptide receptor 2, a receptor for amyloid β 1-42, in TNF- α activated microglia. *J Immunol* 2005; 175:6100-6106.
19. Cui YH, Le Y, Gong W, Proost P, Van Damme J, Murphy WJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. *J Immunol* 2002; 168: 434-442.
20. Iribarren P, Chen K, Hu J, Gong W, Cho EH, Lockett S, et al. CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid β 1-42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein-coupled receptor mFPR2. *FASEB J* 2005; 19: 2032-2034
21. Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998; 187: 23-42.
22. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 451-461.
23. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 4th edition. St Louis (Missouri): Mosby; 2002. p. 412-420.
24. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA*. 2002; 288: 2724-2731.
25. Stratton CW, Sriram S. Review: Association of *Chlamydia pneumoniae* with central nervous system disease. *Microbes and infection* 2003; 5: 1249-1253.
26. Balin Bj, Appelt DM. Role of infection in Alzheimer's disease. *JAOA* 2001; 101: S1-S6.
27. Boelen E, Steinbusch HWM, van der Ven AJAM, Grauls G, Bruggeman CA, Stassen FRM. *Chlamydia pneumoniae* infection of brain cells: An in vitro study. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 524-532.
28. Gieffers J, Reusche E, Solbach W, Maas M. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in brain sections of Alzheimer's disease patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 881-882.

29. Ring RH, Lyons JM. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in the late-onset Alzheimer's brain. J Clin Microbiol 2000; 38: 2591-2594.
30. Tiffany LH, Lavigne MC, Cui YH, Wang JM, Leto TL, Gao JL, et al. Amyloid- β induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes en brain. J Biol Chem 2001; 276: 23645-23652.
31. Boelen E, Steinbusch HWM, Pronk I, Grauls G, Rennert P, Bailly V, et al. Inflammatory responses following *Chlamydia pneumoniae* infection of glial cells. Eur J Neurosci 2007; 25 : 753-760
32. Sczcepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-413 modulate A β_{1-42} induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. J Neuroimmunol 2001; 113: 49-62.
33. Yang J, Hooper WC, Philips DJ, Tondella ML, Talkington DF. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Chlamydia pneumoniae* infection. Infect Immun 2003; 71: 614-620.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Invloed van Chlamydia pneumoniae infectie op amyloid- β opname.

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Bianca Pulinx

Datum: **18.06.2007**