



# RETROGRADE AXONAAAL TRANSPORT BIJ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE MENINGITIS

Opgedragen aan mijn zusje, Arwen Huijgens en moeder  
Daniëlle Zaad

## INHOUD

Deze literatuurstudie duidt het bestaan aan van een niet-hematogene invasieroute van *Streptococcus pneumoniae* meningitis, waarbij er sprake is van transport langs de nervii olfactorii. De rol van gangliosides, Neu5Ac, MR, neurotrofines, NF- $\kappa$ B, OECs en microglia zal in dit artikel worden besproken.

Huijgens, P. (Prana)

Introductie neurowetenschappen

# RETROGRADE AXONAAL TRANSPORT BIJ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE MENINGITIS

*Streptococcus pneumoniae* meningitis is een belangrijke oorzaak van mortaliteit en morbiditeit onder kinderen en ouderen met veelvuldig neurologische complicaties tot gevolg (1). Met name kinderen met *S. pneumoniae* meningitis hebben een verhoogd risico tot het ontwikkelen van neurologische complicaties (75%) (2). Hierbij geldt dat hoe jonger het kind is, hoe groter de kans op neurologische complicaties zal zijn. Afhankelijk van het immuunsysteem van de gastheer kan *S. pneumoniae* (Sp) de mucosa van het ademhalingsstelsel koloniseren zonder dat hier nadelige gevolgen van worden ondervonden (3). Er werd lang gedacht dat hersenvliesontsteking (meningitis) door deze bacterie louter plaats kon vinden via een infectie van het bloed, resulterend in sepsis (bloedvergiftiging) en het doordringen van de bloed-hersenbarrière (4). Onderzoek uit 2001 door Marra en Brigham (5) toonde echter aan dat Sp wellicht via een niet-hematogene route de hersenen kan bereiken. Recenter onderzoek lijkt deze hypothese te bevestigen en stelt dat meningitis mogelijk tot stand kan komen door de cel-invasie van pneumokokken (Sp) via retrograde axonaal transport langs de nn. olfactorii in de neus (1).

De klinische data van patiënten met meningitis zonder voorafgaande bacteriëmie benadrukt de behoefte aan onderzoek naar de factoren die leiden tot het ontstaan van deze ziekte. Deze literatuurstudie onderzoekt daarom de vraag of *Streptococcus pneumoniae* meningitis kan veroorzaken via retrograde axonaal transport. Naar verwachting zal dit antwoord bevestigend zijn, maar is er nog meer onderzoek nodig naar de onderliggende mechanismen en condities die leiden tot invasie van het centraal zenuwstelsel (CNS).

## Ganglioside- en sialzuur gemedieerde infectie

Een van de beste voorbeelden van een onderzoek dat een niet-hematogene infectie route beschrijft is de studie van Ginkel et al in 2003 (1). In dit onderzoek werd o.a. gebruik gemaakt van de Sp stam EF3030 die niet in staat is te overleven in het bloed en de avirulente stam R36A zonder kapsel. De aanwezigheid van EF3030 in de *Bulbus olfactorius* (OB) en het CNS werd gezien als een bewijs voor retrograde axonaal transport langs de nervii olfactorii (ON). Daarnaast bleek na voorafgaande incubatie van pneumokokken met asialoGM1 of gemixte ganglioside (GLS) micellen in fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), de hoeveelheid koloniserende units (cfu) sterk te zijn afgenomen in het CNS en de longen. Dit wekt de suggestie dat GLS die in neuronen tot expressie komen op het membraan, een rol spelen in de binding van de Sp via diens C-polysacchariden.

Deze hypothese komt overeen met de in hetzelfde onderzoek onderzochte noodzakelijkheid van een kapsel bij Sp. Bij toediening van de R36A stam werden er op dag 4 vrijwel geen cfu's waargenomen in alle gemeten weefsels. Hieruit valt af te leiden dat een capsule noodzakelijk is voor invasie van het CNS, wat overeenkomt met de aanname dat Sp GLS bindt via de C-polysacchariden op het kapsel. De 'dikte' van de capsule is daarnaast bepalend voor de route die Sp zal nemen bij invasie. Een 80% reductie van het kapsel leidde niet tot verminderde nasale kolonisatie, maar wel tot de observatie dat transparant-fase varianten met dunne kapsels makkelijker de neus koloniseren en overgaan tot een niet-hematogene invasie van het CNS dan de opaque-fase variant, die eerder tot systemische infecties leidt.

In een studie naar de rol van sialzuur in 2016 door Hatcher et al (6) wordt het voorstel gedaan dat vrij sialzuur als activerend signaal werkt voor Sp om zijn niche in de nasopharynx te verlaten en over te

gaan tot invasie van het CNS. Toediening van sialzuur aan het muizen infectiemodel leidde tot een toename in het door whole-body imaging waargenomen aantal cfu's. Sialzuur is een algemene term voor een groep neuraminezuren, waarvan het N-acetylneuraminezuur Neu5Ac/NANA de meest voorkomende is op het membraan van zoogdieren. Sp bezit zelf neuraminidases die de -2,6 en -2,3 bindingen van het Neu5Ac kunnen verbreken. Het is mogelijk dat de continue klieving van sialzuur in vivo nodig is voor de invasie. Ook kan het zo zijn dat sialzuur de expressie van de neuraminidases van Sp induceert. Uit het aantal gereduceerde cfu's bij het gebruik van een neuraminidase mutant kan worden afgeleid dat deze mutant minder goed tot invasie instaat is. Daarnaast bleek het effect van Neu5Ac niet louter af te hangen van de koolhydraat beschikbaarheid, doordat de additie van Neu5Gc ontoereikend bleek te zijn voor het reproduceren van het invasiepatroon van Neu5Ac. Deze resultaten bevestigen de hypothese dat Sp via een directe route de hersenen kan bereiken via de ON en dat het sialzuur Neu5Ac hier een stimulerende rol in speelt door Sp tot invasie aan te zetten. Het precieze mechanisme achter deze translocatie is voornamelijk onbekend en vereist dan ook verder onderzoek.

## Endocytose door mannose-receptorbinding in olfactorii omgevende cellen

Macedo-Ramos et al (7) publiceerde in 2010 een onderzoek over mannose receptor (MR) gemedieerde endocytose in olfactorii omgevende cellen (OECs). Hierin werd onderzocht of OECs in vitro de MR tot expressie brachten en of deze receptoren Sp kunnen internaliseren.

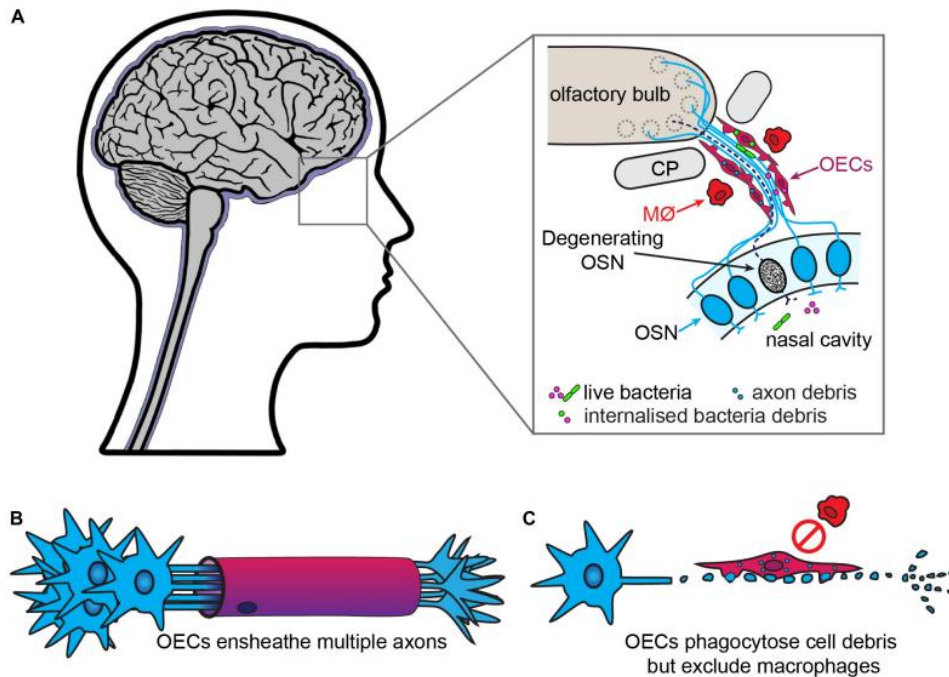
OECs zijn een speciaal type gliacellen die meerdere axonen omsluiten, zie figuur 1 (8). De axonen van de ON lopen door het lamina cribrosa naar de OB en dient als een potentiële infectieroute voor Sp. OECs bezitten een dubbele functie zoals later naar voren komt in het onderzoek van Macedo-Ramos in 2016 (9), de een regeneratief en de ander immuun. Vanwege deze toen al vermoede betrokkenheid in het immuunsysteem werden OECs in 2010 (7) onderzocht op de aanwezigheid van MR, een familielid van de patroon herkenningsreceptoren (PRRs). PRRs spelen een belangrijke rol in de afweer van pathogenen door herkenning van pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs) die o.a. leiden tot de activering van de nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) (9). De resultaten van dit onderzoek wezen uit dat OECs inderdaad een mannan-geblokkeerd lectine, volgens de onderzoekers hoogstwaarschijnlijk MR zelf, tot expressie brachten en in staat waren Sp te internaliseren (7). De aanwezigheid van bacteriën werd aangetoond door een antistof tegen pneumokokken oppervlakte eiwit A en een PCR van het pneumolysin gen dat een specifieke virulentiefactor van Sp is.

## Regulatie van pro-inflammatoire factoren door NF- $\kappa$ B

Een ander onderzoek door Macedo-Ramos in 2016 (9) bevestigde de waarneming van deze internalisering door aan te tonen dat Sp in staat is te overleven in OECs, maar niet in microglia. Toediening van het pro-inflammatoir cytokine IFN- $\gamma$  leidde tot een verlaging van de MR expressie en een vermindering van de geïnfecteerde cellen door Sp. Of deze vermindering daadwerkelijk het effect was van een verminderde MR expressie is niet zeker te zeggen. Er kunnen andere factoren zijn geweest, zoals de activatie van induceerbaar NO synthase (iNOS) die evenals door IFN- $\gamma$  wordt geïnduceerd. Om deze mogelijkheid verder te onderzoeken werd er gemeten wat de concentratie iNOS en NO was in geïnfecteerde cellen. Deze concentratie bleek laag te zijn, maar door IFN- $\gamma$  kon de expressie van iNOS weer toenemen en daarmee ook de productie van NO.

NF- $\kappa$ B is een transcriptiefactor die betrokken is in de synthese van pro-inflammatoire cytokinen, waaronder NO door iNOS. Translocatie van NF- $\kappa$ B naar de kern is daarom essentieel voor de productie van iNOS, maar dit proces wordt geremd door een hoog gehalte van een eindproduct van het NO metabolisme: NO $_2^-$ . Zolang NO $_2^-$  wordt geproduceerd zal het de translocatie van NF- $\kappa$ B verhinderen. Gezien Sp na lyse van geïnfecteerde OECs in staat bleek te zijn te overleven in deze cellen, moet de bacterie een mechanisme hebben ontwikkeld om een inflammatoire reactie te voorkomen. Door

monitoring van de NF- $\kappa$ B translocatie in combinatie met de gemeten lage NO en iNOS waarden, werd duidelijk dat Sp mogelijk in staat is de expressie van iNOS te onderdrukken. Deze waarnemingen laten zien dat Sp afbraak door OECs en activatie van de immuunfunctie van deze cellen tegenwerkt. OECs zijn daarom een mogelijke 'verstoppert' voor het immuunsysteem en zouden kunnen dienen als een infectieroute om het brein te bereiken zonder infectie van het bloed. Omdat dit type cellen de axonen van de ON omsluit, zouden bacteriën via transport langs de axonen in de OECs de hersenen kunnen bereiken. Het zou ook kunnen zijn dat de zenuwcellen zelf de bacteriën opnemen na infectie van de OECs, waarna Sp via retrograde transport in het neuron zelf de hersenen bereikt. Hier is verder nog geen onderzoek naar gedaan en het precieze mechanisme hierachter is dan ook nog onbekend.



*Figuur 1: OECs omgeven de axonen van de nervii olfactorii en hebben een dubbele functie (8). (A) De axonen van de sensorische olfactorii neuronen (OSN) lopen van de neusholte naar het lamina cribrosa of in het Engels: the cribriform plate (CP). OSN worden voortdurend vervangen, waarbij de overblijfselen worden gefagocytiseerd door OECs. (B) OECs omgeven meerdere axonen die niet worden gemyeliniseerd. (C) Na celdood fagocyteren OECs de celresten zonder macrofagen (MØ) te rekruteren.*

## Regulatie van neurotrofines door Sp

Naast de hiervoor besproken immuunfunctie van OECs bezitten de cellen ook een regeneratieve functie. Ze ondersteunen axonale groei door afgifte van neurotrofines. Dit zijn speciale overlevingsfactoren waar in 2016 door Ruiz-Mendoza et al onderzoek naar werd gedaan (3). In dit onderzoek werden de mRNA levels gemeten van neurotrofine-3 (NT-3), gliacellijn-afgeleide neurotrofe factor (GDNF) en hersenen-afgeleide neurotrofe factor (BDNF). De expressie van NT-3, BDNF en GDNF in de OB bleek in geïnfecteerde muizen duidelijk lager te zijn dan in de niet-geïnfecteerde groep. In vitro infectie van OECs liet daarentegen een ander resultaat zien. BDNF en groep box 1 met hoge mobiliteit (HMGB1) namen toe in expressie. Daarnaast viel op dat het geconditioneerde medium van geïnfecteerde OECs de expressie van pro-apoptisch gekleefd-caspase-3 induceerde in N13 microglia. Bovendien bleek er sprake te zijn van continue NF- $\kappa$ B activatie. Een verklaring voor dit verschijnsel zou het bestaan van een oplosbare factor kunnen zijn die na infectie van OECs met Sp wordt geproduceerd. Of deze verklaring representatief is voor de werkelijkheid moet nog worden onderzocht.

Ten slotte is in dit onderzoek nog aandacht besteed aan de mechanismen waarmee Sp de activatie van microglia voorkomt. Aangezien BDNF microglia kan activeren en stimuleren tot migratie en afgifte van Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), is een afname van de expressie voordelig voor Sp. Hetzelfde geldt voor GDNF die de fagocytose activiteit van microglia stimuleert. De waargenomen resultaten lijken dus aan te sluiten op de hypothese dat Sp zijn omgeving beïnvloed door regulatie van de door OECs tot expressie gebrachte neurotrofines en daarmee ook de activatie van microglia.

Een uitzondering op deze redenering is het expressiepatroon van NT-3. Hoewel dit onderzoek wel de expressie heeft kunnen aantonen, kon een studie door Lipson et al (10) NT-3 niet detecteren in het lysaat van OECs. NT-3 zou daarom ook de functie van een anti-inflammatoire factor kunnen hebben in tegenstelling tot BDNF en GDNF. Om de functie van NT-3 beter in kaart te brengen is dan ook meer onderzoek vereist.

## Conclusie en discussie

Het doel van deze studie was om te onderzoeken of *Streptococcus pneumoniae meningitis* kan veroorzaken via retrograde axonaal transport. Voor de beantwoording van deze vraag leverde Ginkel et al (1) een grote bijdrage door aan te tonen dat Sp meningitis kan ontstaan via infectie van de nasofarynx in de afwezigheid van bacteriëmie. Het gebruik van de EF3030 stam stelde de onderzoekers in staat vast te stellen dat de isolatie van pneumokokken uit het CNS, het gevolg was van mogelijk axonaal transport. Tevens bleek deze infectie ganglioside-gemedieerd te zijn.

Een latere studie door Hatcher et al (6) bevestigde dit door het gebruik van in vivo whole body imaging toe te passen voor het direct lokaliseren van infectiesites na nasale toediening van de bacterie. Hieruit kwam naar voren dat het sialzuur Neu5Ac een bevorderend effect heeft op de invasie van Sp.

Tot slot toonden Macedo-Ramos et al (7) aan dat Sp kan worden herkend en geïnternaliseerd door OEC's via mannose receptorbinding, maar niet kan worden afgebroken, (9) doordat het de productie van iNOS dereguleert evenals de productie en afscheiding van groeifactoren zoals NT-3, BDNF en GDNF (3). Dit heeft een onderdrukking van de immuunrespons tot gevolg.

Infectie van de hersenvliezen in de afwezigheid van bacteriëmie spreekt de assumptie dat pneumokokken alleen meningitis kan veroorzaken via het bloed tegen. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat Sp het CNS via transport langs de ON kan bereiken. Het precieze mechanisme achter dit transport is echter nog niet bekend en vereist daarom verder onderzoek. Met name op het gebied van de ontstekingsreactie valt hierin nog veel winst te behalen.

Ter samenvatting, deze studie heeft een in vivo route voor Sp infectie van de hersenen beschreven in de afwezigheid van bacteriëmie. Deze route suggereert het transport van Sp langs de nervii olfactorii door de olfactorii omgevende cellen. Bewijs voor direct retrograde axonaal transport in het neuron zelf is vooralsnog onvoldoende aanwezig.

Deze route is daarentegen niet de enige mogelijkheid. Filippidis en Fountas (11) noemen de nasale lymfevaten als mogelijke toegang tot het CNS. Vervolgonderzoek zou zich hierop kunnen richten.

Een beter begrip van de factoren die meespelen in de gastheer, het proces achter de ontstekingsreactie en de Sp-specifieke eigenschappen kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van gerichtere therapeutische middelen naast de behandeling van dexamethason en antibiotica.

## Referenties

1. van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM, Campos-Torres A, Parish LA, Briles DE. Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc Natl Acad Sci*. 25 november 2003;100(24):14363–7.
2. Zainel A, Mitchell H, Sadarangani M. Bacterial Meningitis in Children: Neurological Complications, Associated Risk Factors, and Prevention. *Microorganisms*. 5 maart 2021;9(3):535.
3. Ruiz-Mendoza S, Macedo-Ramos H, Santos FA, Quadros-de-Souza LC, Paiva MM, Pinto TCA, e.a. *Streptococcus pneumoniae* infection regulates expression of neurotrophic factors in the olfactory bulb and cultured olfactory ensheathing cells. *Neuroscience*. maart 2016;317:149–61.
4. Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. mei 2003;4(5):376–85.
5. Marra A, Brigham D. *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. *Infect Immun*. december 2001;69(12):7318–25.
6. Hatcher BL, Hale JY, Briles DE. Free Sialic Acid Acts as a Signal That Promotes *Streptococcus pneumoniae* Invasion of Nasal Tissue and Nonhematogenous Invasion of the Central Nervous System. *Infect Immun*. 19 augustus 2016;84(9):2607–15.
7. Macedo-Ramos H, Campos FSO, Carvalho LA, Ramos IB, Teixeira LM, De Souza W, e.a. Olfactory ensheathing cells as putative host cells for *Streptococcus pneumoniae*: Evidence of bacterial invasion via mannose receptor-mediated endocytosis. *Neurosci Res*. 1 april 2011;69(4):308–13.
8. Nazareth L, St John J, Murtaza M, Ekberg J. Phagocytosis by Peripheral Glia: Importance for Nervous System Functions and Implications in Injury and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 8 april 2021;9:660259.
9. Macedo-Ramos H, Ruiz-Mendoza S, Mariante RM, Guimarães EV, Quadros-de-Souza LC, Paiva MM, e.a. *Streptococcus pneumoniae* resists intracellular killing by olfactory ensheathing cells but not by microglia. *Sci Rep*. 9 november 2016;6(1):36813.
10. Lipson AC, Widenfalk J, Lindqvist E, Ebendal T, Olson L. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp Neurol*. 1 april 2003;180(2):167–71.
11. Filippidis A, Fountas KN. Nasal lymphatics as a novel invasion and dissemination route of bacterial meningitis. *Med Hypotheses*. 1 juni 2009;72(6):694–7.