

Mechanisms of bacterial-epithelial interaction in Crohn's disease



Ida Schoultz

Disputation: 17 april 2009 vid Linköpings Universitet

Opponent: Associate Professor Nicola Jones, University of Toronto

Huvudhandledare: Professor Johan Dabrosin Söderholm

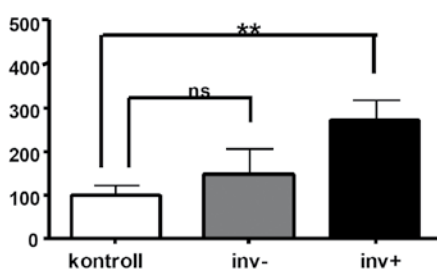
Biträdande handledare: Docent Maria Lerm

Utvecklingen av Crohns sjukdom har visat sig beror på samspelet mellan flera olika faktorer. En viktig faktor är det genetiska arvet som har visat sig spela en betydande roll då flera mutationer har identifierats som resulterar i en nedsatt förmåga hos patienter att försvara sig mot både sjukdomsframkallande bakterier och kroppens egen tarmflora, vilket leder till en ökad inflammation, karaktäristiskt för Crohns sjukdom.

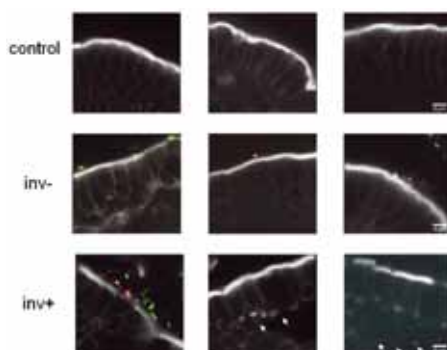
I tarmen tas vanligtvis bakterier samt delar av dessa upp via det så kallade follikelassocierade epitelet, vilket är specialiserade på att ta upp främmande ämnen för att sedan starta och förstärka kroppens immunförsvar mot dessa. Denna väg utnyttjas av flera sjukdomsframkallande bakterier, bland annat *Yersinia pseudotuberculosis* för att ta sig in i kroppen och ge en infektion. Medan de omgivande delarna av tarmen, det så kallade villusepitelets främsta funktion har ansetts vara att ta upp vätska och näring.

I denna avhandling presenteras resultat som visar att till skillnad mot vad man tidigare har trott påverkas även villusepitelet av *Yersinia pseudotuberculosis*. Efter påverkan av *Yersinia pseudotuberculosis* observeras en tydlig ökning av villusepitelets förmåga att ta upp mycket små partiklar. Detta visas extra tydligt då transporten av nanopartiklar är mest markant efter det att det humana villusepitelet blivit utsatt för vildtyp-stammen av *Yersinia pseudotuberculosis* (inv+) vilken uttrycker ett ytprotein kallat invasin, jämfört med en muterad stam av *Yersinia pseudotuberculosis* (inv-) som saknar invasin (figur 1). Dessa nanopartiklar kan liknas vid modeller för delar av främmande bakterier och sjukdomsframkallande partiklar. Detta skulle kunna ha betydelse för utvecklingen av Crohns sjukdom där tarmbakterier har en central roll och där möjligheten finns att andra bakterier bidrar till en liknande

ökning i villusepitelets förmåga att ta upp bakterieprodukter som bidrar till tarminflammationen.



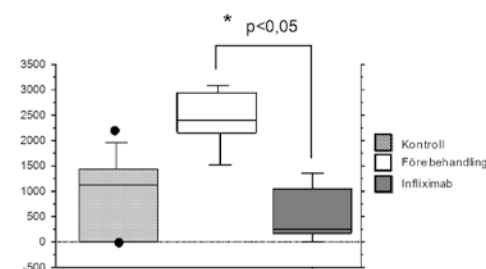
Figur 1A. Biopsier från villusepitelet i ileum togs från patienter som kom för rutinkontroll på Universitetssjukhuset i Linköping. Nanopartikeltransporten studerades i en så kallad Ussingkammare, där biopsin spändes upp i en buffertmiljö liknande kroppens och bakterier tillsattes till slemhinnan för att efter 2h tas bort och ersättas med nanopartiklar som sedan samlades upp och mättes då de passerat slemhinnan. Här visas transporten av nanopartiklar över villusepitelet efter tillsats av vildtyp-stammen av *Y. pseudotuberculosis*, vilken uttrycker ytproteinet invasin (inv+), eller en muterad stam av *Y. pseudotuberculosis*, vilken saknar invasin (inv-) jämfört med oexponerat villusepitel. En signifikant ökning av partikeltransport skedde efter tillsats av vildtypen av *Y. pseudotuberculosis*.



Figur 1B. Konfokal mikroskopibilder av ileumbiopsier efter Ussingförsök, internaliserade partiklar kunde bara identifieras efter tillsats av vildtyp-stammen av *Y. pseudotuberculosis*, inv+. Vitt = F-aktin, Green = *Y. pseudotuberculosis*, Red = nanopartiklar. (x63 objective, x4 zoom).

Av de bakterier som har visats vara av stor betydelse för Crohns sjukdom har en speciell uppmärksamhet riktats mot en särskild grupp av bakterier, de så kallade adherenta invasiva *E. coli*-stammarna. Forskare har visat att dessa återfinns i tarmväggen hos patienter med Crohns sjukdom i ett större antal jämfört med friska personer och har en ökad förmåga att invadera tarmslemhinnan och där sedan föröka sig. Detta leder till en ökad inflammation i tarmen.

I avhandlingen visas att infliximab minskar dessa bakteriers förmåga att ta sig igenom tarmslemhinnan (figur 2).



Figur 2. Biopsier från tjocktarmen togs från patienter med Crohns sjukdom före det att behandling med infliximab påbörjades, efter fyra veckors behandling togs nya biopsier och transporten av en speciell stam av adherenta invasiva *E. coli* studerades i Ussingkammare. Här visas att patienter med Crohns sjukdom innan påbörjad behandling har en hög transport av bakterier över slemhinnan jämfört med patienter utan Crohns sjukdom (kontroll), efter behandling med infliximab minskar transporten av adherenta invasiva *E. coli* signifikant.

Detta innebär att infliximab inte bara dämpar inflammationen genom att binda till cytokinen TNF α och på så sätt förhindra ytterligare aktivering av immunförsvaret, utan också gör det svårare för bakterier att ta sig igenom tarmslemhinnan.

Att Crohns sjukdom till stor del beror på en störd interaktion mellan bakterier och slemhinna stöds också av nya gene-

tiska fynd. Forskare har visat att genetiska förändringar av ett protein kallat Nod2 är av särskild betydelse för Crohns sjukdom. Nod2 känner igen främmande delar av bakterier som redan tagit sig in i kroppen. Detta resulterar i att kroppen direkt kan starta ett immunförsvar mot dessa bakterier och kämpa för att få bort dem ifrån kroppen. Många patienter med Crohns sjukdom har en defekt i arvsmassan för Nod2 som gör att det inte känner igen bakterier på rätt sätt och därför ger ett ökat inflammatoriskt svar.

I avhandlingen visas att detta protein bryts ned i cellen via en särskild väg där mycket små proteiner kallade ubiquitin märker ut det Nod2 som ska brytas ned. Detta fynd har stor betydelse för att ytterligare förstå hur denna grupp av proteiner regleras av cellen. Det ger också en ny infallsvinkel på uppkomsten av Crohns

sjukdom och innebär att andra proteiner som deltar i själva märkningen av Nod2 med ubiquitin kan vara associerade med sjukdomen. Flera proteiner med liknande egenskaper som Nod2 existerar i kroppen. Särskilt uppmärksammat är det stora proteinkomplex kallat inflammasomen som finns inne i cellerna. Inflammasomen fungerar som en plattform för att känna igen olika partiklar från tarmen, inte bara bakterier, och hjälper också kroppen att starta ett försvar för att bekämpa bakterier och infektioner.

I avhandlingen visas att svenska män som har defekter i den del av arvsmassan som styr bildandet av proteinerna NALP3 och CARD8, vilka båda ingår i inflammasomen, har en ökad risk att utveckla Crohns sjukdom. Detta fynd ger ytterligare stöd och bevis för att samspelet mellan bakterier och

tarmslemhinna inte fungerar korrekt hos patienter som lider av Crohns sjukdom. Detta visar också att orsaken bakom utvecklingen av sjukdomen kan skilja mellan män och kvinnor.

Referenser:

- Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Törkvist L, Fredrikson M, Sjöqvist U, Lördal M, Tysk C, Lerm M, Söderkvist P, Söderholm J D (2009). Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men. *Am J Gastroenterol*. May;104(5):1180-8.
- Ragnarsson E G, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson A H, Tafazoli F, Lerm M, Magnusson K E, Söderholm J D, Artursson P (2008). *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest*. Nov;88(11):1215-26.