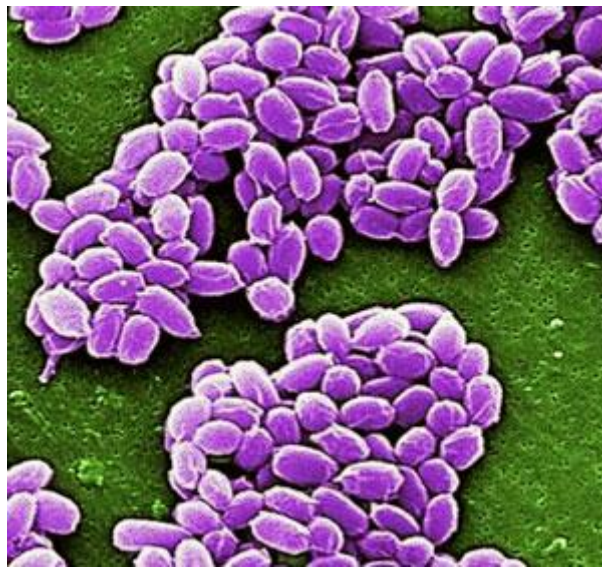


De biochemische processen bij de infectie van *Bacillus* *anthracis*



Petra Zijlstra

22 augustus 2015

S922470

Begeleiders:

Teresa Dias Pedro Gomes

en

Erik-Jan van Baalen

Inhoudsopgave

Voorwoord	4
Samenvatting	5
Inleiding	6
Hoofdstuk 1. Bacteriën: indeling, vorm en opbouw	7
Hoofdstuk 2. <i>Bacillus anthracis</i>	10
Hoofdstuk 3. De drie type besmettingen van <i>Bacillus anthracis</i>	12
3.1 Algemeen	12
3.2 Cutane anthrax	12
3.3 Respiratoire of inhalatie-anthrax (wolsorteerdersziekte)	12
3.4 Gastro-intestinale anthrax	12
Hoofdstuk 4. De entree en eerste vermenigvuldiging in het besmette lichaam	13
4.1 Algemeen	13
4.2 Infectie via het “Trojaanse paard” model	13
4.3 Infectie via het Jailbreakmodel	15
4.4 De invloed van het immuunsysteem	16
4.4.1 Fagocytose	17
4.4.2 Fagocytose en de verschillende type immuunsysteemcellen	19
Hoofdstuk 5. De infectie van <i>Bacillus anthracis</i> , verder in het lichaam	20
5.1 Inleiding	20
5.2 De aanhechting, entree van PA, LF en EF	21
5.3 De biochemische processen in de geïnfecteerde cel	23
5.3.1 Inleiding	23
5.3.2 De aanhechting van PA, EF en LF en de daaropvolgende reacties in de cel	23
5.3.3 De biochemische reacties in de cel na entree van LF en EF	25
5.3.3.1 De hechting van PA ₈₃ en het vrijkomen van LF en EF in het cytosol	25
5.3.3.2 De werking van EF	25
5.3.3.3 De werking van LF	26
5.3.3.4 Algemene conclusie	27
5.3.4 Aantasting van de onderlinge celstructuur door LT	29
5.3.5 De gevolgen van de aantasting van het epitheliale en endotheliale weefsel	30

5.3.6 De gevolgen van de aantasting van het epitheliale en endotheliale weefsel op diverse lichaamssystemen	32
Conclusie	34
Discussie	35
Literatuurlijst	37
Bijlagen	39

Voorwoord

Afgelopen jaar is er een groot infrastructureel project aangelegd rondom Leeuwarden. Dit betekende dat veel van de bodem moest worden omgeploegd. Maar een deel van een weiland liet men ongemoeid liggen omdat er een miltvuurbosje stond. In Nederland mogen deze bosjes niet worden gekapt en de grond waarop deze bomen groeien mag niet worden afgevoerd. Er moet een reden zijn waarom men zo voorzichtig met deze locatie omgaat. Maar waarom? Ik weet dat miltvuur voor anthrax staat en dat het dan gaat om de bacterie *Bacillus anthracis*.

Ook op het moment dat ik het dit verslag afrond, komt er nieuws over het per ongeluk verspreiden van anthrax door laboratoria in de VS. Dit is te vinden in bijlage 2. Waarom kan zoiets nu wereldnieuws worden?

Blijkbaar gaan er diverse alarmbellen rinkelen als deze bacterie in beeld komt. Daar wilde ik meer over weten. Heeft deze bacterie speciale trucs om zo gevaarlijk te zijn?

Mijn dank wil ik uitspreken naar Teresa Dias Pedro Gomes en Erik-Jan van Baalen voor de begeleiding van dit verslag vanuit Hogeschool Windesheim. Tevens wil ik mijn dank uitspreken naar Sylvia de Witt, Gauke Zijlstra en Klaas Alkema voor de tips die zij mij gegeven hebben om het verslag taalkundig te herschrijven. Tot slot wil ik Wies Koopman, Reni Freund en Hetty Zeedijk bedanken voor hun tips die ze mij gaven vanuit het biologische perspectief.

Samenvatting

Bacillus anthracis is een Gram-positieve bacterie, die een zeer dodelijk infectie kan veroorzaken. De bacterie kan wel tachtig jaren als spore overleven in de natuur en kan zeer goed tegen hitte (10 min. koken), koude temperaturen, extreem hoge of lage pH en chemicaliën. Als de omgevingsfactoren (temperatuur 8-45 graden Celsius, pH 5-9 en vochtigheidsgraad >95) veranderen, gaat de spore ontkiemen. Daarna vindt deling plaats van de bacterie. Gevolgd weer door sporulatie.

Daarbij zijn drie type besmettingen bekend. Namelijk de cutane anthrax, de respiratoire of inhalatie-anthrax en de gastro-intestinale anthrax. De infectie van *Bacillus anthracis* kan goed bestreden worden met antibiotica, als de geïnfecteerde op tijd geholpen wordt.

De onderzoeksvraag luidt: Welke processen zijn verantwoordelijk voor de infectie door *Bacillus anthracis* bij zoogdieren?

De conclusie is dat er verschillende biochemische processen verantwoordelijk zijn voor de infectie van *Bacillus anthracis*. De infectie van *Bacillus anthracis* kan als spore via het "Trojaanse paard" model of via het Jailbreakmodel optreden. *Bacillus anthracis* bezit het exotoxine PA₈₃. Deze exotoxine gebruikt *Bacillus anthracis* bij het infecteren van het lichaam en bij de verdere infectie van het lichaam. PA₈₃ vormt samen met ANTRX1(TEM8) ANTRX2(CMG2) een complex. Hieraan gaan LF en EF zich hechten. Via het proces van endocytose komen LF en EF in het cytoplasma. Daar gaan zij allerlei biochemische reacties veroorzaken in het lichaam, die van invloed zijn op het immuunsysteem, het bloedvatenstelsel, het hormoonstelsel en het zenuwstelsel. Ook wordt apoptose gestimuleerd. De infectie van *Bacillus anthracis* kan dus zeer grote gevolgen hebben voor het geïnfecteerde lichaam.

Inleiding

Bacillus anthracis is een bacterie waar voorzichtig mee moet worden omgegaan. De sporen van *Bacillus anthracis* kunnen namelijk wel tachtig jaar overleven. Zodra de omgevingsfactoren gunstig worden (temperatuur 8-45 graden Celsius, pH 5-9 en vochtigheidsgraad >95) gaat de spore ontkiemen. Daarna vindt de vermenigvuldiging plaats van de bacterie. Dit wordt gevolgd door sporulatie (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu [RIVM], 2011).

Miltvuur wordt veroorzaakt door de bacterie *Bacillus anthracis*. Het is een zeer besmettelijke ziekte, en tot in de 1^e helft van de vorige eeuw gingen hele veestapels er aan dood. De kadavers werden diep in de grond gegraven, en de plek werd gemarkeerd met bomen. Deze miltvuurbosjes liggen overal verspreid in het landschap en mogen niet zomaar geruimd worden (RIVM, 2011). Figuur 1 laat een miltvuurbosje zien in het landschap.



Figuur 1: miltvuurbosje (2013). Overgenomen van <http://www.gezondheidenco.nl/65531/miltvuur-gifspoor-uit-het-verleden-door-miltvuurbosjes/>

In de 2^e wereldoorlog werd *Bacillus anthracis* ingezet als biologisch wapen. Militairen die gaan vechten in het Midden Oosten worden preventief gevaccineerd tegen een besmetting met *Bacillus anthracis* (Goel, 2015). Het verspreiden van miltvuursporen via poederbrieven in 2001 in de VS, heeft onze samenleving doen beseffen dat we kwetsbaar zijn (RIVM, 2011).

De infectie met *Bacillus anthracis* staat bekend om zijn snelle, dodelijke afloop. De geïnfecteerde kan ineens zeer ziek worden, waarbij behandeling met antibiotica bijna geen nut meer heeft (RIVM, 2011).

In dit onderzoek zullen de biochemische processen die verantwoordelijk zijn voor de voor de infectie door *Bacillus anthracis* bij zoogdieren centraal staan. Daarbij komt aan de orde hoe de infectie het lichaam binnenkomt en op welke wijze de infectie daarna in het lichaam processen beïnvloedt.

De onderzoeksvraag luidt: Welke processen zijn verantwoordelijk voor de infectie door *Bacillus anthracis* bij zoogdieren?

Deelvragen zijn:

1. Wat voor type bacterie is *Bacillus anthracis*?
2. Op welke manieren vindt infectie plaats?
3. Hoe werkt het biochemische proces van infectie?
4. Welke delen van het lichaam zijn daarbij kwetsbaar?

Hoofdstuk 1. Bacteriën: indeling, vorm en opbouw

Bacteriën behoren tot de prokaryoten. Ze bezitten geen celkern, maar wel een celwand. Bacteriën worden ingedeeld in twee groepen, namelijk Gram-positief en Gram-negatief. De vorm van de bacterie kan zijn: spiraalvorm, draadvorm, komvorm, staafvorm en in een ronde vorm. Bacteriën kunnen autotroof of heterotroof zijn (Madigan, Martinko, Stahl & Clark, 2012).

De bacterie is opgebouwd uit een capsule, celwand, celmembraan en cytoplasma. In dit cytoplasma bevinden zich een circulair DNA-molecuul en ribosomen. Soms is een plasmide ingesloten. Ook kan een bacterie een flagel bezitten om zich te verplaatsen (Madigan et al., 2012).

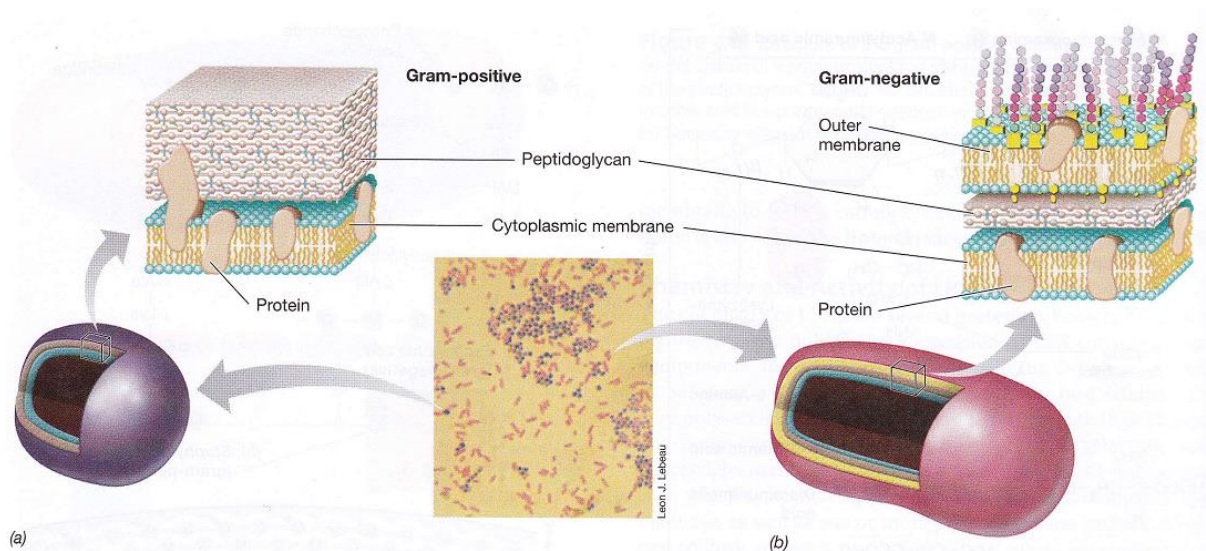
De celmembraan bestaat uit een dubbele laag van fosfolipiden. In deze semi-vloeibare laag liggen proteïnen. De meeste van deze proteïnen zijn hydrofoob. Ze kunnen zich aan beide kanten van het celmembraan bevinden, maar er ook helemaal doorheen. Ze worden dan integrale membraanproteïnen genoemd. Het celmembraan is een permeabel membraan, waarbij de proteïnen allerlei biochemische processen katalyseren (Madigan et al., 2012).

De celwand van bacteriën bestaat uit peptidoglycan. De osmotische druk in het cytoplasma is behoorlijk groot. De celwand zorgt ervoor dat de bacterie niet barst. Bovendien bepaalt het ook de vorm en de stijfheid (Madigan et al., 2012).

Peptidoglycan is een polysaccharide dat opgebouwd is uit twee suikerderivaten, namelijk N-acetylglucosamine en N-acetylmuramic zuur. En een aantal aminozuren, waaronder L-alanine, D-alanine, D-glutaminezuur en lysine of diaminopimelic acid (DAP). Deze aminozuren vormen tezamen de repeterende structuur van glycan tetrapeptide. Peptidoglycan kan worden aangetast door o.a. lysosomen. Deze splitsen de β -1,4-glycosidic verbindingen tussen N-acetylglucosamine en N-acetylmuramic zuur (Madigan et al., 2012).

Bacteriën worden ingedeeld in twee groepen, namelijk Gram-positief en Gram-negatief. Dit heeft te maken met een verschil in celwandstructuur. In Gram-negatieve bacteriën komen cross-link verbindingen tot stand tussen DAP en de carboxylgroep van D-alanine. Bij Gram-positieve bacteriën komen deze cross-link verbindingen tot stand tussen de korte peptide verbinding en diverse aminozuren. Elke Gram-positieve bacterie heeft daarbij zijn eigen verbinding (Madigan et al., 2012).

De basisstructuur van peptidoglycan blijft de verbinding tussen N-acetylglucosamine en N-acetylmuramiczuur. De structuur van glycan tetrapeptide is daaronder gekoppeld en kan vele varianten hebben. In figuur 2 staat dit verschil weergegeven tussen de celwandstructuur van Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën. 90% van de celwandstructuur van Gram-positieve bacteriën bestaan uit een duidelijk dikkere laag peptidoglycan. Bij Gram-negatieve bacteriën bestaat 10% van de celwandstructuur uit peptidoglycan. Bovendien kent de Gram-negatieve bacterie een buitenmembraan, die een aantal uitstekende onderdelen kent. Dit zijn lipopolysacchariden, die toxisch zijn (Madigan et al., 2012).



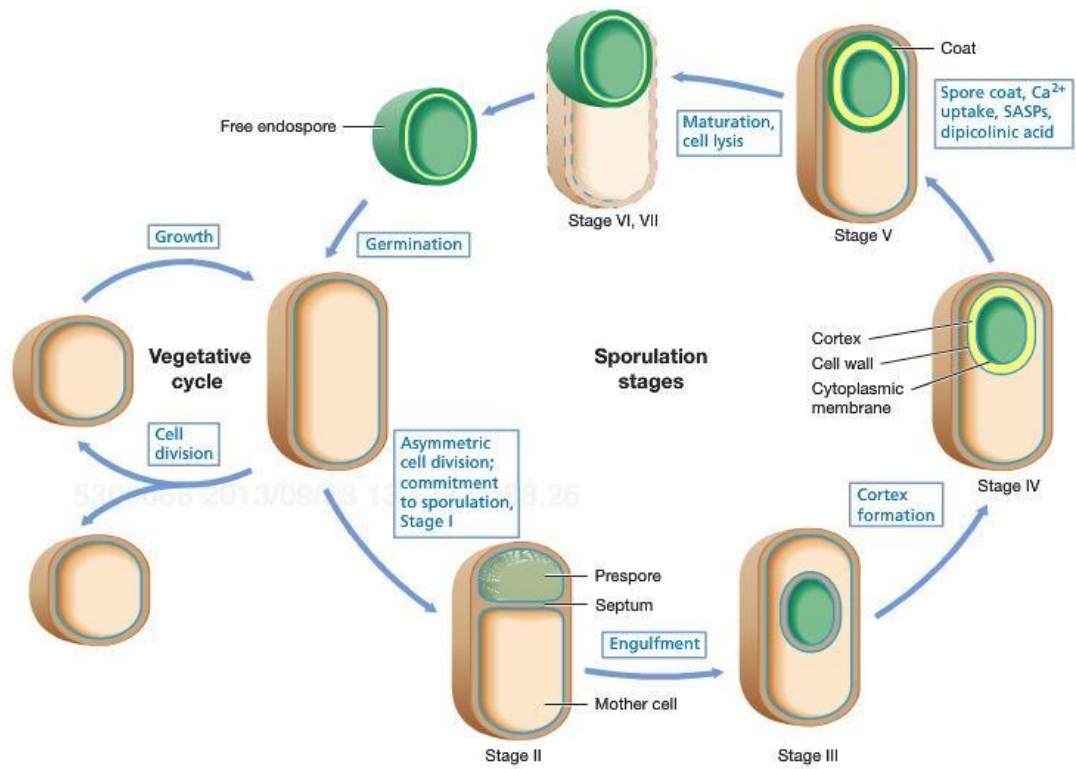
Figuur 2. Celwand van Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën

(Madigan et al., 2012)

De buitenkant van een bacterie kan ook een capsule bevatten of een slijm laag. Deze lagen kunnen bestaan uit polysacchariden of proteïnen, waarmee ze zich aan oppervlakten van een gastheer kunnen hechten. Een capsule kan door het immuunsysteem van de gastheer slecht worden herkend en vernietigd. Daardoor heeft de bacterie een betere overlevingskans (Madigan et al., 2012).

Een bacterie kan ook een plasmide bezitten. De plasmide bevat ook genen, maar deze zijn niet essentieel. Ze kunnen wel handig zijn voor het functioneren van de bacterie. De meeste plasmiden kennen een ronde vorm, soms ook lineair en de grootte ervan kan ook variëren. De functie van plasmiden varieert van het produceren van antibioticum tot een rol spelen bij de conjugatie, het metabolisme, de resistentie en de virulentie (Madigan et al., 2012).

Bij de bacteriegeslachten *Bacillus* en *Clostridium* kan ook endosporen worden gevormd. In figuur 3 wordt weergegeven op welke wijze deze vorming van een endospore plaatsvindt. De vorming van endosporen komt tot stand omdat de leefcondities slechter worden. Er zijn verschillende stadia tijdens het vormen van de endospore. Stadium I kent een asymmetrische celsplitsing. In stadium II is de prespore nog door een septum gescheiden van de moeder cel, waarna in stadium III deze opgaat in de moeder cel. In stadium IV wordt een cortex, een celwand en een cytoplasmamembraan gevormd. Hierna wordt in Stadium V een spore ingekapseld en heeft Ca^{2+} en SASP_s opname plaatsgevonden. Ca^{2+} vormt een verbinding met dipicolinezuur en een complex ontstaat. Dit zorgt voor de binding van water en voorkomt dus dehydratatie. Ook gaat het een verbinding aan met het DNA aan, waardoor deze beter bestand is tegen verhitting. SASP heeft een hechte verbinding met het DNA, waardoor het DNA beschermd is tegen UV-licht, uitdroging en verhitting. In stadium VI en VII vindt lysis van de spore plaats, waarna er een vrije endospore aanwezig is (Madigan et al., 2012).



Figuur 3. Verschillende stadia in endospore formatie
(Madigan et al., 2012)

Hoofdstuk 2. *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis is de eerste bacterie geweest die uitgebreid werd bestudeerd. Het was Koch die deze bacterie ook gebruikte om bewijzen te zoeken voor het functioneren van pathogenen. Hij formuleerde daarna zijn postulaten (Madigan et al., 2012).

Pasteur bracht een verzwakte *Bacillus anthracis* in bij een dier en zag dat deze niet ziek werd. Het zorgde echter wel voor immuniteit bij het geïnfecteerde dier. De opgedane kennis was de start van de vaccinatie in de medische wetenschap (Madigan et al., 2012).

Bacillus anthracis behoort tot de *Bacillus cereus* groep. Daartoe behoren *Bacillus cereus*, *Bacillus myoides*, *Bacillus pseudommyoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis* en *Bacillus cytotoxicus*. Recente studies hebben aangetoond dat deze bacteriën eveneens anthraxkenmerkende ziektes veroorzaken, ook bij de mens. In India is bijvoorbeeld een *Bacillus cereus* stam gevonden die het PA-gen bezat, maar niet het pXO1 en pXO2 plasmide (zie hoofdstuk 5, bladzijde 20) (Goel, 2015).

De miltvuurbacterie (anthrax) is een zoönose, die wordt veroorzaakt door de aerobe sporenvormende bacterie *Bacillus anthracis*. Een infectie met deze bacterie kwam in het verleden regelmatig voor. Maar door vaccinatie van risicogroepen en dieren is het aantal besmettingen drastisch gedaald. In westerse landen komt de ziekte nauwelijks meer voor. In Afrika, Azië en het Midden-Oosten echter nog wel (Goel, 2015).

In het verleden is anthrax ingezet als biologisch wapen. Dit vond o.a. plaats in de 2^e Wereld Oorlog. In 2001 is via de zogenaamde poederbrieven anthrax verspreid in de VS. Het inzetten van anthrax als dodelijk wapen kan nog steeds (Goel, 2015; Madigan et al., 2012).

Bacillus anthracis is een aerobe Gram-positieve staafvormige bacterie. Meestal liggen ze als korte ketens bij elkaar en ze zijn omgeven door een kapsel. In vivo worden geen sporen gevormd (Madigan et al., 2012).

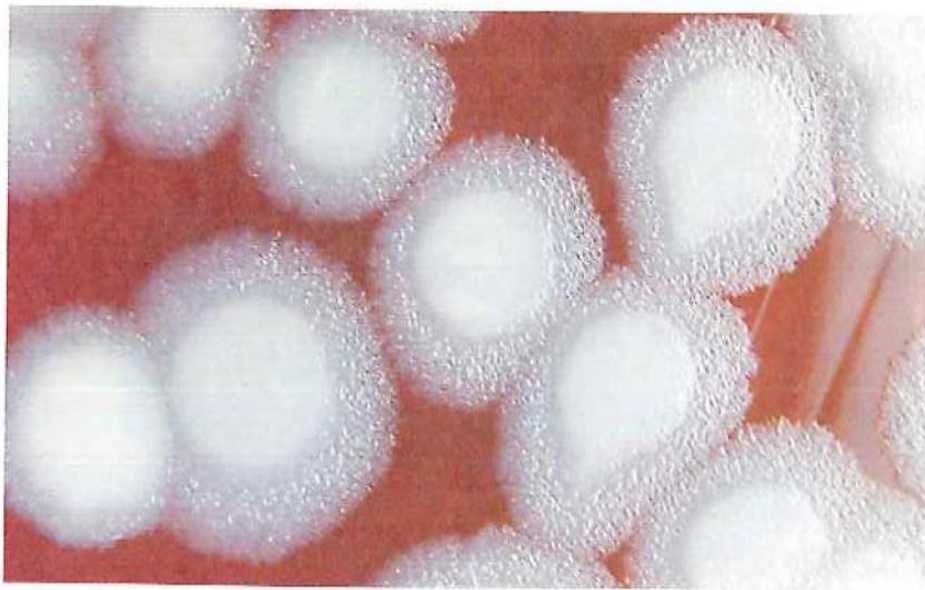
Sporen van anthrax kunnen in de bodem worden teruggevonden. Deze zijn daar terecht gekomen doordat de vegetatieve vorm via een geïnfecteerd dier(of mens) daarin is achter gebleven, waardoor anthrax gaat sporuleren. Deze sporen zijn zeer resistent. Ze kunnen tegen hitte (10 min. koken), koude temperaturen, pH en chemicaliën. Ze kunnen wel tachtig jaar overleven in de bodem. Als de omgevingsfactoren (temperatuur 8-45 graden Celsius, pH 5-9 en vochtigheidsgraad >95) veranderen, gaat de spore ontkiemen. Vervolgens vindt deling van de bacteriën plaats, waarna weer sporulatie optreedt. Behalve de sporen, kunnen ook de vegetatieve vormen van anthrax infectie veroorzaken bij mens en dier (RIVM, 2011).

De meest bekende *Bacillus anthracis* stammen zijn Ames, Sterne en Vollum. Ames is uitgebreid onderzocht. Deze stam is zeer besmettelijk en bezit beide plasmides pXO1 en pXO2(zie hoofdstuk 5, bladzijde 20). Ames komt voor in de VS en Groot Brittannië. Sterne komt voor in Canada. Sterne is toxisch, maar bezit niet de pXO2 plasmide. Deze stam wordt gebruikt voor onderzoek naar de aanmaak van vaccins voor dieren. Vollum is een laag virulente stam, die gebruikt wordt voor onderzoekstudie en toxine-productie. Deze stam komt voor in de VS, Spanje en Zimbabwe (Goel, 2015).

In figuur 4a wordt een microscopische opname van *Bacillus anthracis* weergegeven, waarin de endosporen goed zichtbaar zijn. In figuur 4b is een *Bacillus anthracis* kolonie te zien op een bloedagarplaat.



(a)



(b)

Figuur 4. *Bacillus anthracis*

a. Microscopische opname van *Bacillus anthracis*. Endospore mooi zichtbaar

b. *Bacillus anthracis* kolonie op bloedagarplaat.

(Madigan et al., 2012)

Hoofdstuk 3. De drie type van besmetting van *Bacillus anthracis*

3.1 Algemeen

Er zijn drie typen van besmetting van *Bacillus anthracis*. Dat zijn de besmetting via de huid (cutane anthrax), via het maag-darmstelsel (gastro-intestinale anthrax) en via de luchtwegen (respiratoire of inhalatie-anthrax) (RIVM, 2011) .

3.2 Cutane anthrax

Deze vorm van besmetting gaat via de beschadigde huid (schaafwondjes, insectenbeten). De plekken waar deze besmetting dikwijls plaatsvindt, zijn de handen, nek en gezicht. Er ontstaat een pijnloos, jeukend papeltje dat snel overgaat in een blaartje. Deze gaat over in een zweer die bedekt is met een zwarte korst (eschar). Hieromheen ontstaat vaak een ring van blaasjes en een uitgebreide oedemateuze zwelling, die wel enige weken kan duren. Behalve oedemateuze zwelling komt ook vaak zwelling van de lymfeklieren voor. Als de zwarte korst heeft losgelaten, blijft er een permanent litteken achter. Ook kan er hoofdpijn, lichte koorts en malaise optreden. Deze vorm van besmetting kan met antibiotica bestreden worden. Zou dat niet gebeuren, dan zal 10-20% van de onbehandelde gevallen een sepsis krijgen, die gepaard gaat met hoge koorts en pijnlijke regionale lymfeklierzwelling. De kans op een dodelijk afloop is hoger als deze infectie in de nek, het gezicht of op de borst plaatsvindt (RIVM, 2011).

3.3 Respiratoire of inhalatie-anthrax (wolsorteerdersziekte)

Deze besmetting lijkt in eerste instantie op een milde, aspecifieke luchtweginfectie (malaise, vermoeidheid, lichte koorts, niet-productieve hoest en myalgie). Na 2-4 dagen ontstaat echter ernstige kortademigheid, met cyanose, hoge koorts, bloederig sputum. Als deze vorm van anthrax niet behandeld wordt met antibiotica, dan overlijdt meer dan 80% van de geïnfecteerden. (RIVM, 2011).

3.4 Gastro-intestinale anthrax

Voedsel dat met anthrax besmet is, kan infectie veroorzaken. Daarbij ontstaan twee klinische beelden:

1. De abdominale vorm: het begin is aspecifiek met misselijkheid, braken en koorts. Hierna ontstaat hevige buikpijn gepaard gaande met hematemesis en bloederige diarree. Het klinische beeld lijkt op een acute buikontsteking.
2. De orofaryngeale vorm: hierbij zijn de belangrijkste verschijnselen dysfagie, koorts, lymfeklierzwelling in de nek en sepsis. Zelfs met behandeling zal ongeveer 50% een dodelijke afloop kennen.

Patiënten die besmet zijn met de drie bovenstaande klinische vormen van anthrax (cutane, respiratoire en gastro-intestinale) kunnen meningitis oplopen. Dit komt voor bij ca. 5% van de besmettingen en si in bijna 100% van de gevallen dodelijk (RIVM, 2011; Weiner & Glomski, 2012).

Hoofdstuk 4. De entree en eerste vermenigvuldiging in het besmette lichaam

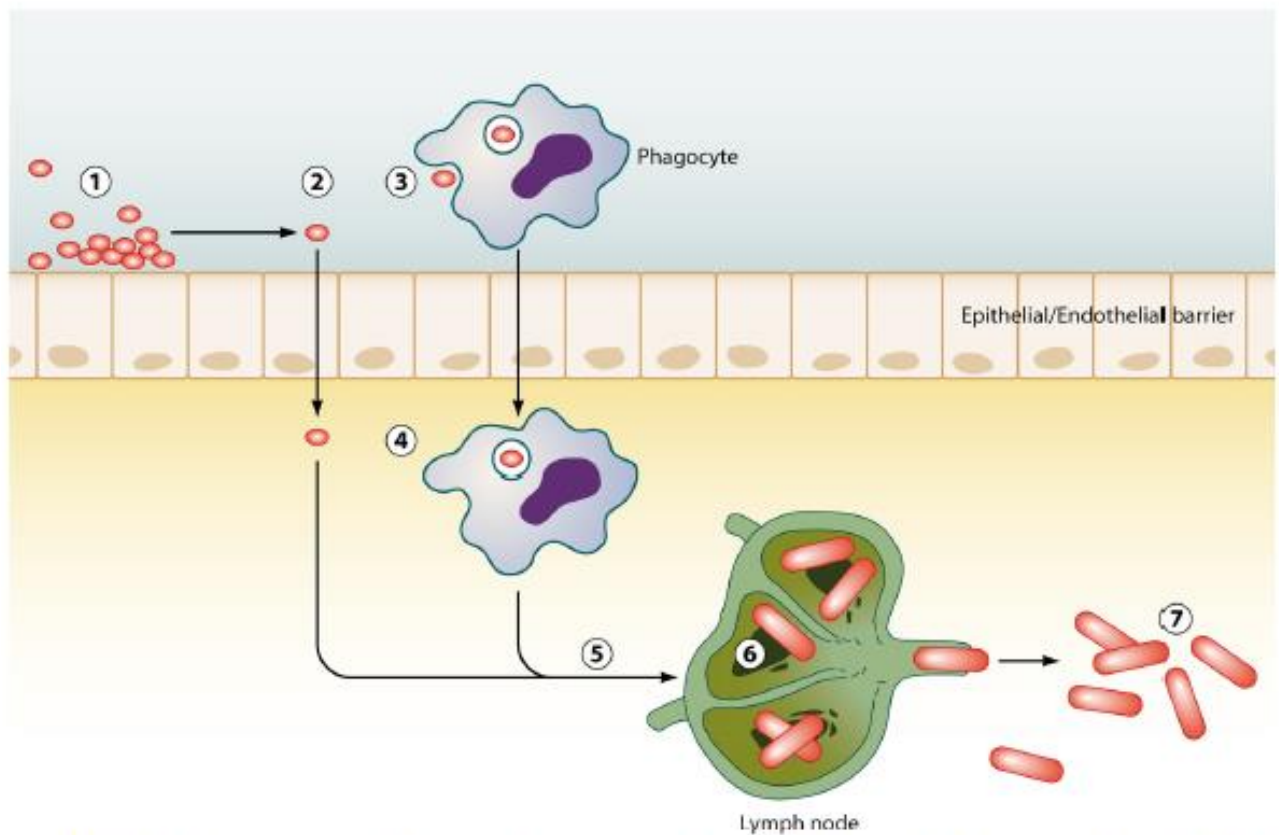
4.1 Algemeen

De infectie van de bacterie bestaat uit de entree in het lichaam en de daadwerkelijke werking in het besmette lichaam. Het onderzoek naar de infectie van *Bacillus anthrax* is nog volop bezig. Daarbij wordt vooral gekeken naar de wijze van infectie bij proefdieren. De daadwerkelijk infectie vindt plaats als de spore van *Bacillus anthracis* het lichaam bereikt en kan binnenkomen. Bij inhalatie anthrax wordt gedacht aan het “Trojaanse paard” model. Bij deze vorm van anthrax is ook de grootte van de aerosole luchtdeeltjes van belang. Hoe kleiner, hoe effectiever de infectie is. Ook is er het Jailbreakmodel. In dit Jailbreakmodel wordt er vanuit gegaan dat de infectie rechtstreeks door de beschadigde huid gaat of door het epitheelweefsel van de maagdarmsysteem en de luchtwegen (Weiner & Glomski, 2012).

4.2 Infectie via het “Trojaanse paard” model

Het was in 2002 dat Guidi-Rontani de infectiewijze via het zogenaamde “Trojaanse paard” model lanceerde. Uit eerder onderzoek van Joan Ross in 1957 en Lincoln et al in 1965 bleek dat *Bacillus anthracis* macrofagen gebruikt. Het onderzoek van Lincoln et al toonde ook aan dat de infectie eerst de lymfeknopen gebruikt alvorens naar de bloedbaan te gaan. Dit model wordt als **het model** geaccepteerd voor de infectie van *Bacillus anthracis*. Dit model geeft weer op welke wijze *Bacillus anthracis* alveolaire macrofagen gebruikt om het longepithelium te passeren waarna het de mediastinale lymfklieren gaat infecteren. Uiteindelijk komen de vegetatieve cellen dan in de bloedbaan terecht, waarna de infecterende werking kan plaatsvinden in het lichaam (Weiner & Glomski, 2012).

Figuur 5 laat zien hoe het infectiemodel van het “Trojaanse paard” werkt.



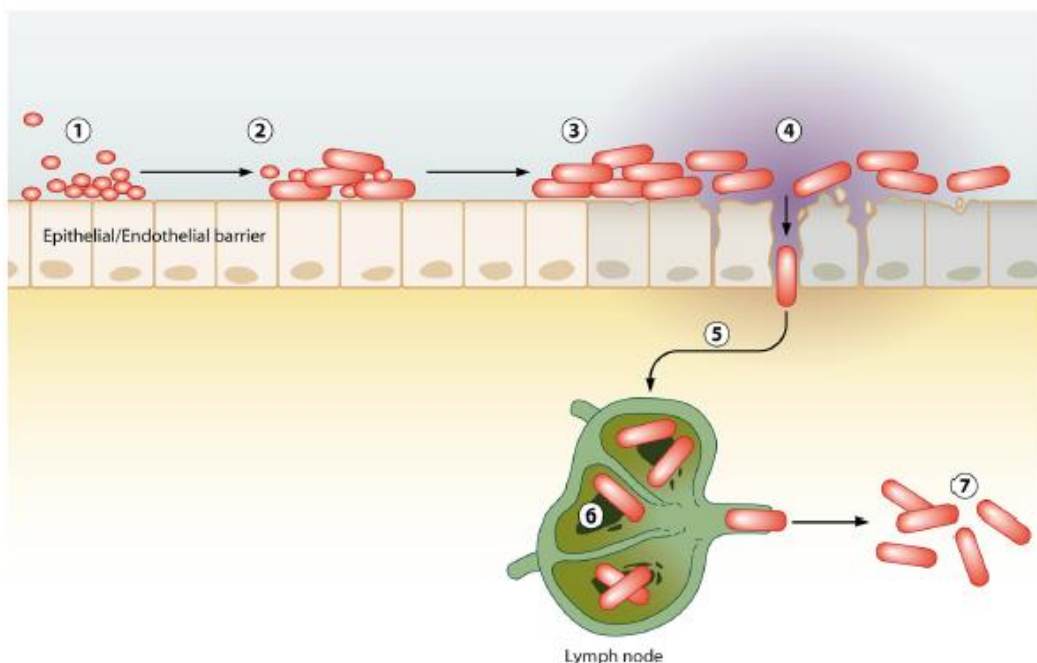
Figuur 5. Infectiemodel van het “Trojaanse paard”

(Weiner & Glomski, 2012)

Bij deze manier van infectie komen de sporen binnen via de lumena van de luchtwegen, het maagdarmkanaal of via de huid (1). Het epithelium wordt direct aangevallen door de sporen (2) of ze gaan zich via fagocytose (3) verschuilen. Dit kan zowel een macrofaag als een dendritische cel zijn. De spore kan verborgen het epithelium passeren. Ook kan het via transcytosis rechtstreeks door het epithelium gaan (4). De sporen gaan nu naar de lymfeknoop (5). Eenmaal daarin gaan ze uitgroeien tot vegetatieve bacteriën. Hierbij vermenigvuldigen zij zich, vormen exotoxinen en capsules(6). Daarbij kan ook de lymfeknoop ten ondergaan. De bacterie kan via deze route de bloedsomloop bereiken en de rest van het lichaam infecteren(7) (Weiner & Glomski, 2012).

4.3 Infectie via het Jailbreakmodel

Mogelijk vindt er ook een andere start van de infectie plaats. Uit onderzoek bij dieren blijkt dat *Bacillus anthracis* zich graag vermeerderd op de beschadigde huid, in het epitheelweefsel van de maagdarmsysteem en in de luchtwegen. Uit onderzoek van Weiner en Glomski (2012) blijkt dat monocysten, macrofagen en neutrofielen zelfs een bescherming kunnen zijn tegen de infectie van *Bacillus anthracis*. Het is dus de vraag of het logisch is dat *Bacillus anthracis* infecteert via het model van het Trojaanse paard. Ook andere pathogenen, bijvoorbeeld salmonella en klebsiella, kiezen voor diverse wegen om binnen te komen. Het beschermende weefsel in het darmstelsel (Gut-associated lymphoid tissue(GALT)) en in de luchtwegen (Nasally associated lymphoid tissue(NALT)) en beschadigde huid blijken ideale plaatsen te zijn voor de sporen van *Bacillus anthracis* om zijn virulente factoren te activeren. Deze virulente factoren kunnen het immuunsysteem (zie par 4.3.3) en permeabel weefsel aanvallen. Hierdoor kunnen de vegetatieve cellen zich vestigen in de lymfeknoop. Figuur 6 geeft deze route weer.



Figuur 6. Infectie van het Jailbreakmodel

(Weiner & Glomski, 2012)

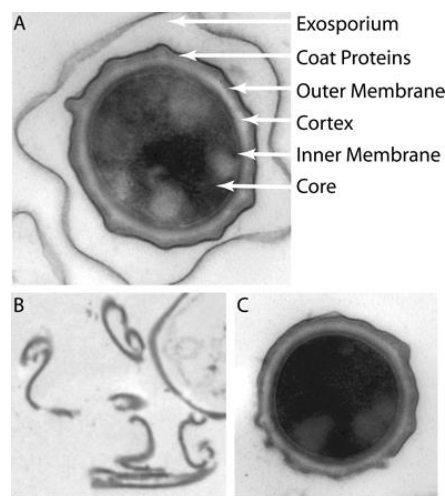
Via deze infectie komen de sporen binnen via de lumina van de luchtwegen, maagdarmkanaal of de huid(1). De sporen ontwikkelen zich en er worden exotoxine-producerende niet gekapselde bacteriën(2) gevormd. Vegetatieve cellen gaan zich nu vermeerderen, waarbij ze steeds meer exotoxinen en proteasen produceren. Dit tezamen breekt de epitheliale/endotheliale barrière af(3). De vegetatieve cellen passeren vervolgens de beschadigde barrière, waarna ze via het lymfevatensstelsel naar een lymfeknoop gaan. Ze maken daarbij geen gebruik van fagocytosetransport(5). In de lymfeknoop gaat het proces van de productie van exotoxines en vermeerdering door(6). Dit kan tot gevolg hebben dat de lymfeknoop ten onder gaat. Vervolgens gaan de vegetatieve cellen naar de bloedsomloop, waarna zij de rest van het lichaam infecteren(7) (Weiner & Glomski 2012).

4.4 De invloed van het immuunsysteem

Bacillus anthracis kent niet altijd een efficiënte manier van infectie. Het immuunsysteem kan de bacterie elimineren. Het feitelijke infectiemechanisme is voor een groot deel nog onbekend. Zoals in de paragrafen 4.2 (“Trojaanse paard” model) en paragraaf 4.3 (Jailbreakmodel) staat beschreven, zijn er vermoedelijk meerdere wijzen van binnenkomen in een lichaam. Dit kan betekenen dat de spore uitgroeit tot een vegetatieve cel en daarna het lichaam binnenkomt (bijvoorbeeld via een wond) of dat deze via fagocytose het lichaam binnenkomt (Weiner & Glomski, 2012).

Voordat de spore de infectie start moet deze spore wel actief worden. De omgevingsfactoren moeten daarvoor veranderen. Dit kan doordat de temperatuur tussen de 8-45 graden komt te liggen, de pH tussen de 5-9 komt te liggen of de vochtigheidsgraad > 95 wordt. Daarbij gaat de spore zich uiteindelijk ontwikkelen tot een vegetatieve cel. Voedingsstoffen en/of zouten en een waterrijk milieu helpen daarbij. *Bacillus anthracis* herkent daarbij specifieke signalen van de gastheer. Deze signalen kunnen specifieke aminozuren en nucleoside combinaties zijn. Deze laatste worden herkend door een familie van gerA-like sensor operons. Deze activatie van de sensoren wordt verondersteld het initiatiemoment te zijn van de ontwikkeling van de spore. Hierna volgt de hydratatie van de kern, uitstoot van cationen en dipicolinic zuur, barsten van de cortex en de start van het vegetatieve metabolisme. Bij deze start komt de productie van virulente factoren op gang (zie hoofdstuk 4) (Liu et al, 2004).

Figuur 7 laat de verschillende onderdelen van de spore zien.



Figuur 7. Transmissie electronen micro-opname van *Bacillus anthracis* endospore (Liu et al., 2004)

A = intact spore	Exosporium: buitenste laag van de spore
B = vrij exosporium	Coat proteins: coat eiwitten,
C = Nude spore	Outer Membrane: buiten membraan
	Cortex: cros-linked peptidoglycaanlaag
	Inner Membraan: binnenste membraan
	Core: kern

4.4.1 Fagocytose

In het “Trojaanse paard” model is de fagocytose van macrofagen een centraal onderdeel van de infectie. Daarom wordt in dit onderdeel stil gestaan bij het proces van fagocytose in het algemeen en in het bijzonder de manier waarop *Bacillus anthracis* dit uitvoert.

Bij fagocytose wordt de pathogeen herkend m.b.v. een Toll-like receptor (TLR). Deze receptoren hechten zich aan het oppervlak van de pathogeen. Daarna zal een fagocyt de pathogeen in zich opnemen in een vacuole. De fagocyt gaat vervolgens samen met een lysosoom. Daarbij zal eerst de pathogeen door gassen van het lysosoom worden vergiftigd. Daarna gaan lysozymen en andere enzymen van het lysosoom de onderdelen van de pathogeen verder opruimen (Campbell et al, 2011).

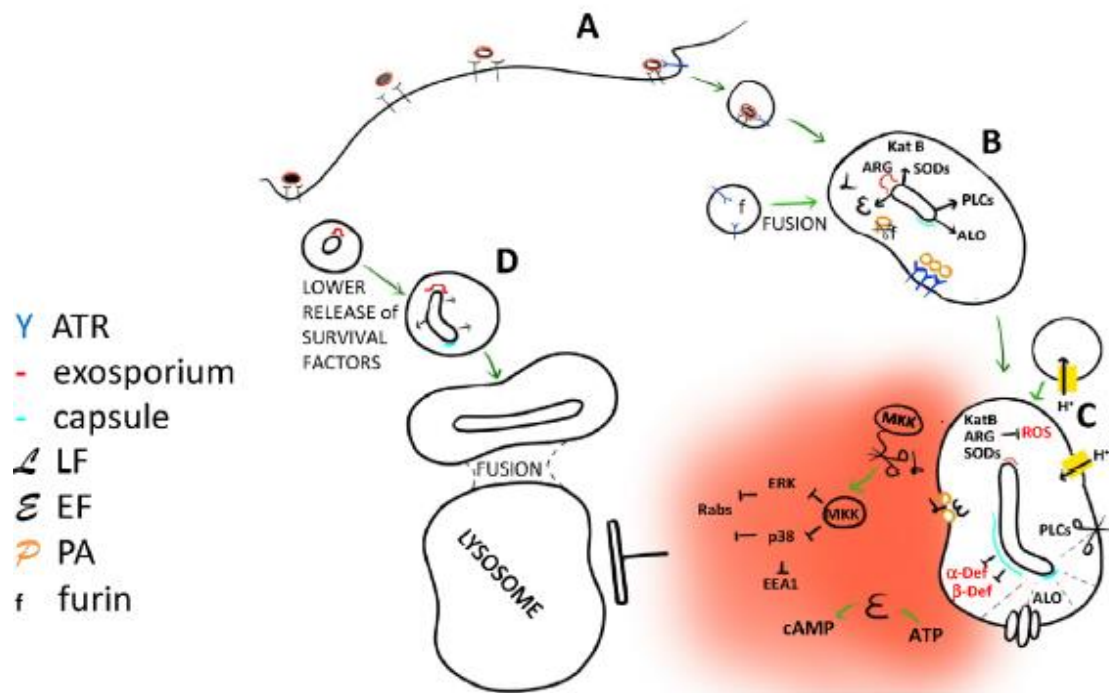
Bacillus anthracis maakt ook gebruik van fagocytose. Het is een belangrijk onderdeel van de infectiewijze via het “Trojaanse paard” model. In dit model maakt *Bacillus anthracis* juist gebruik van de macrofaag om zich te verplaatsen naar de lymfeklieren. *Bacillus anthracis* heeft zijn eigen manier van fagocytose. Figuur 8 staat weergegeven hoe de wijze van fagocytose plaatsvindt. Ook wordt hierin weergegeven dat *Bacillus anthracis* in de macrofaag kan worden geëlimineerd (Tonello & Zorretta, 2012).

De fagocytose begint bij **A**. Daar heeft de spore contact met membraanreceptoren van de fagocyte. Dit kunnen Mac-1 of andere receptoren (bijvoorbeeld TLR2) zijn. Via endocytose komt de spore binnen in de fagosoom. Ook kan, als PA (zie hoofdstuk 5, bladzijde 20) aanwezig is in het exosporium, deze zich hechten aan anthrax toxine receptoren (ATR). In hoofdstuk 5, paragraaf 5.2 bladzijde 21 wordt dit ANT XR genoemd (Tonello & Zorretta, 2012).

Eenmaal binnen in de fagosoom (**B**), gaat de spore reageren op intracellulaire factoren en gaat uitgroeien tot een vegetatieve cel. Het gevolg hiervan is dat het de productie van eiwitten activeert. (Tonello & Zorretta, 2012).

De bacterie produceert release factoren, die het inkapselen van de bacterie door de fagosoom tegengaan (**C**). Verder komen LF en EF (zie hoofdstuk 5, bladzijde 20) vrij, die de fusie van de fagosoom met de lysosoom tegengaan. Ook kan deze fusie worden tegengegaan door de capsule, die uit poly- γ -D-polyglutamic zuur bestaat. Bovendien gaat deze capsule de antibacteriële alpha- en bèta-defensieve werking tegen. De toename van oxidant species (ROS), die de bacterie zouden kunnen doden, wordt door *Bacillus anthracis* door diverse factoren zelf tegengegaan. Dit zijn een arginase en twee super oxidizedismutases (SODs) eiwitten en een katalase (KatB). *Bacillus anthracis* produceert ook een andere toxine, namelijk anthrolysin O (ALO). Ook produceert het putative fosfolase C (PLC). De capsule tezamen met ALO en PLC kunnen ervoor zorgen dat de bacterie vrijkomt in het cytosol (Tonello & Zorretta, 2012).

In situatie **D** is het de *Bacillus anthracis* niet gelukt om genoeg biochemische processen opgang te brengen, waardoor het door het lysosoom wordt geëlimineerd. (Tonello & Zorretta, 2012).



Figuur 8. Overlevingsmogelijkheden voor *Bacillus anthracis* in een fagosoom

(Tonello & Zornetta , 2012)

4.4.2 Fagocytose en de verschillende type immuunsysteemcellen

Het feit blijft dat de inhalatie anthrax veel dodelijker is dan de cutane anthrax (Weiner & Glomski, 2012). Mogelijk moet dit gezocht worden in het verschillende type cellen van het immuunsysteem die reageren op de infectie van de slijmvliezen van de luchtwegen (bij inhalatie anthrax) en de huid. Bij inhalatie anthrax worden macrofagen geïnfecteerd door de spore van *Bacillus anthracis* om vervolgens daarin uit te groeien tot een vegetatieve cel. *Bacillus anthracis* laat zich daarna verplaatsen naar de lymfeklieren en zo in de rest van het lichaam terecht te komen zich te vermeerderen (Weiner & Glomski, 2012).

Belangrijk is het feit dat macrofagen ook een beschermende rol kunnen spelen bij de inhalatie anthrax. Deze macrofagen zijn wel afhankelijk van de aanwezigheid van zuurstof om hun eliminerende werking uit te voeren op de exotoxinen. Neutrofielen zijn werkzaam bij de cutane anthrax infectie. Zij zijn minder afhankelijk van zuurstof, omdat zij ook granules bezitten, die antimicrobiële eigenschappen bezitten om exotoxinen te elimineren (Weiner & Glomski, 2012).

Zoals al beschreven, zijn macrofagen juist wel in staat om *Bacillus anthracis* te bestrijden. Dit sluit niet aan bij het model van het “Trojaanse paard”, waarbij de macrofaag een belangrijke rol speelt als transporteur van *Bacillus anthracis*. Onderzoekers hebben aangetoond dat neutrofielen ook een belangrijke eliminerende rol spelen. Dat is te zien aan de hoeveelheid neutrofielen bij de cutane infectie en de inhalatie infectie. Bij de cutane infectie is deze hoger dan bij de inhalatie infectie, waardoor deze laatste mogelijk dodelijker is. Neutrofielen werken ook goed als tweede beschermende factor in het immuunsysteem na de macrofaag (Tonello & Zornetta, 2012).

Een tweede reden waardoor *Bacillus anthracis* fagocytose overleeft komt mogelijk door de conditie van de fagocyt. Het is namelijk nog niet duidelijk waardoor de ene fagocyt wel *Bacillus anthracis* elimineert en de andere fagocyt *Bacillus anthracis* niet elimineert. Dit heeft mogelijk te maken met de conditie van de fagocyt (Tonello & Zornetta, 2012).

Een derde reden of een fagocyt de spore kan aanvallen, ligt in het feit dat dendritische cellen de zwakste schakel zijn. De proteolytische peptides die de spore moeten aanvallen, werken in de dendritische cellen rond pH neutraal. Bovendien kennen zij een kleinere lysosomale proteolyse. Hun werking is dus minder efficiënt. In inhalatie anthrax zijn deze dendritische cellen de boosdoeners. Deze dendritische cellen nemen de sporen toch met zich mee, zoals in het model van het “Trojaanse paard” wordt aangetoond. De sporen komen dan dieper het lichaam binnen. Bovendien hebben de dendritische cellen een dunnere epitheliale of endotheliale cellaag te passeren. Hierdoor komen de vegetatieve cellen nog sneller het lichaam binnen (Tonello & Zornetta, 2012).

Een vierde reden dat de spore toch niet zijn werk kan verrichten, komt mogelijk mede doordat er te weinig PA receptoren of Mac-1 receptoren aanwezig zijn op het fagosomale membraan (Tonello & Zornetta, 2012).

Tot slot is ook het stadium van ontwikkeling van de spore van *Bacillus anthracis* bepalend. Als de spore zich verder heeft ontwikkeld, produceert het andere typen moleculen, waarop de macrofaag kan anticiperen. Ook is het bepalend of de spore zijn ontwikkeling start in of buiten de fagosoom. De ontwikkeling in de fagosoom triggert gen-expressie, die meer pathogeen is. De ontwikkeling van de spore buiten de cel leidt niet altijd tot de aantasting van de fagocyt (Tonello & Zornetta, 2012).

Hoofdstuk 5. De infectie van *Bacillus anthracis*, verder in het lichaam

5.1 Inleiding

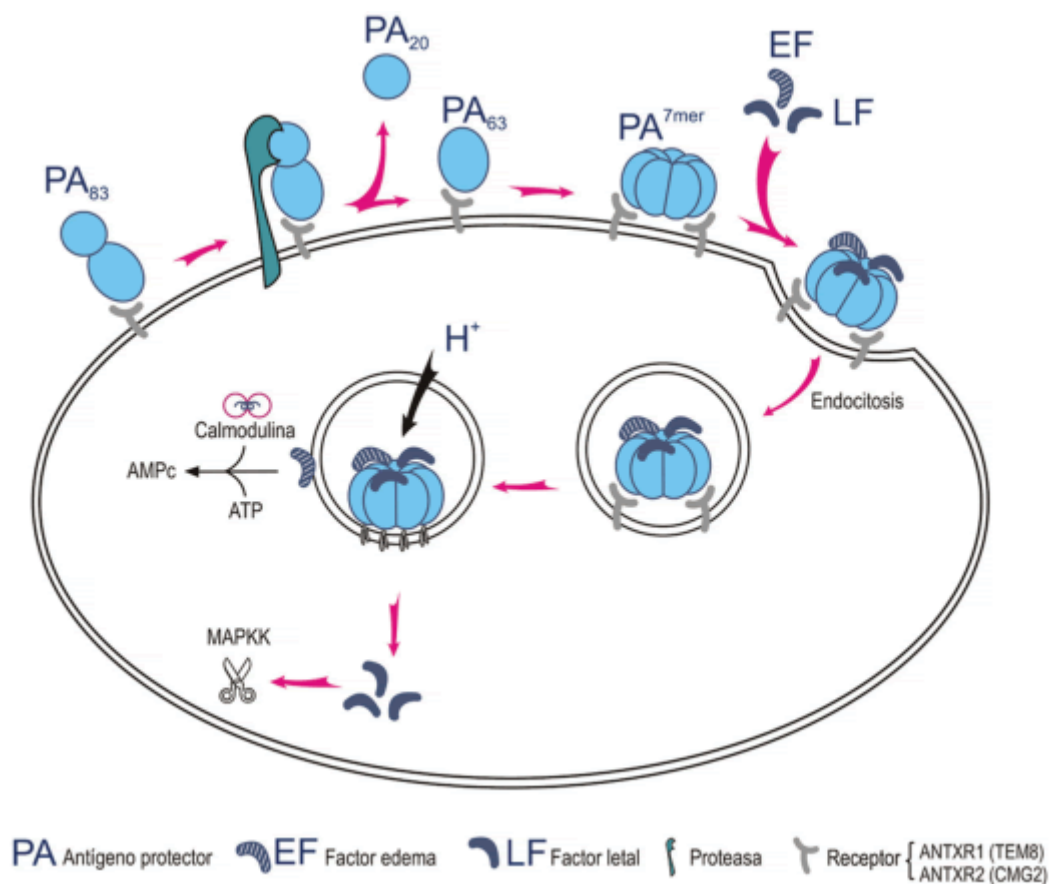
Belangrijk bij het biochemische proces van de infectie is de aanwezigheid van virulente factoren. Dit zijn exotoxinen en de capsule, die door twee verschillende virulente plasmiden gecodeerd worden. Deze virulente plasmiden zijn respectievelijk pXO1 en pXO2. pXO1 maakt de exotoxines, die bestaan uit een receptor-bindend translocase subunit, een protective antigen (PA) en twee enzymatische subunits, lethal factor (LF) en edema factor (EF). Wanneer PA aan LF verbonden is, ontstaat het complex lethal toxine (LT) en wanneer PA aan EF verbonden is, ontstaat edema toxine (ET). pXO2 heeft de code voor het maken van de capsule, die bestaat uit gamma-linked polyglutamic-zuur, dat covalent wordt gebonden aan de celwand. Deze capsule beschermt tegen de fagocytose (Weiner & Glomski, 2012).

De aanhechting van PA aan het celmembraan, gevolgd door de aanhechting van LF en EF heeft vele biochemische processen tot gevolg in het lichaam. In dit hoofdstuk zal dit worden toegelicht.

5.2 De aanhechting, entree van PA, LF en EF

Een belangrijk onderdeel van de infectie is het samengaan van PA, LF en EF. Het is een A-B toxine. PA is de B subunit, die een combinatie maakt met LF en EF. Dit zijn de A subunits. Deze vormen respectievelijk de lethal toxine (LT) en edema toxine (ET).

Figuur 9 laat dit proces van samen gaan van PA, LF en EF zien. De eerste stap is de hechting van PA aan het oppervlak van een aan te vallen cel (zie linksbovenaan in figuur 8). Anthrax PA is 83 kD en de hechting vindt plaats aan de anthrax toxine receptoren ANT XR1 (TEM8) en ANT XR2 (CMG2). ANT XR is eerder ATR genoemd in hoofdstuk 4, paragraaf 4.4.1. Bij deze hechting speelt furine (protease) ook een rol. Er vindt een splitsing plaats in PA 20 kD en PA 63 kD. PA 63 kD vormt samen met 6 andere gelijke eenheden een hetamersisch complex, met een preporie (P^{7mer}). Aan deze preporie hechten zich 3 of 4 eenheden van LF en EF of een combinatie ervan, die via endocytose in een zuurder milieu komen. Door deze pH verandering verandert de structuur van het complex en vormt de preporie een tunnel. Deze tunnel wordt gebruikt om LF en EF toxines naar het cytosol te brengen, waarna de enzymatische processen de cel kapot maken. EF blijft gekoppeld aan het endosomale membraan rondom de kern, waarbij het een perinucleair snoer vormt. LF wordt losgelaten in het cytosol. EF en LF gaan hun werking vanaf nu uitoefenen op MAPKK en AMPc (cAMP) (Goel, 2015, 20; Pavan et al., 2011).

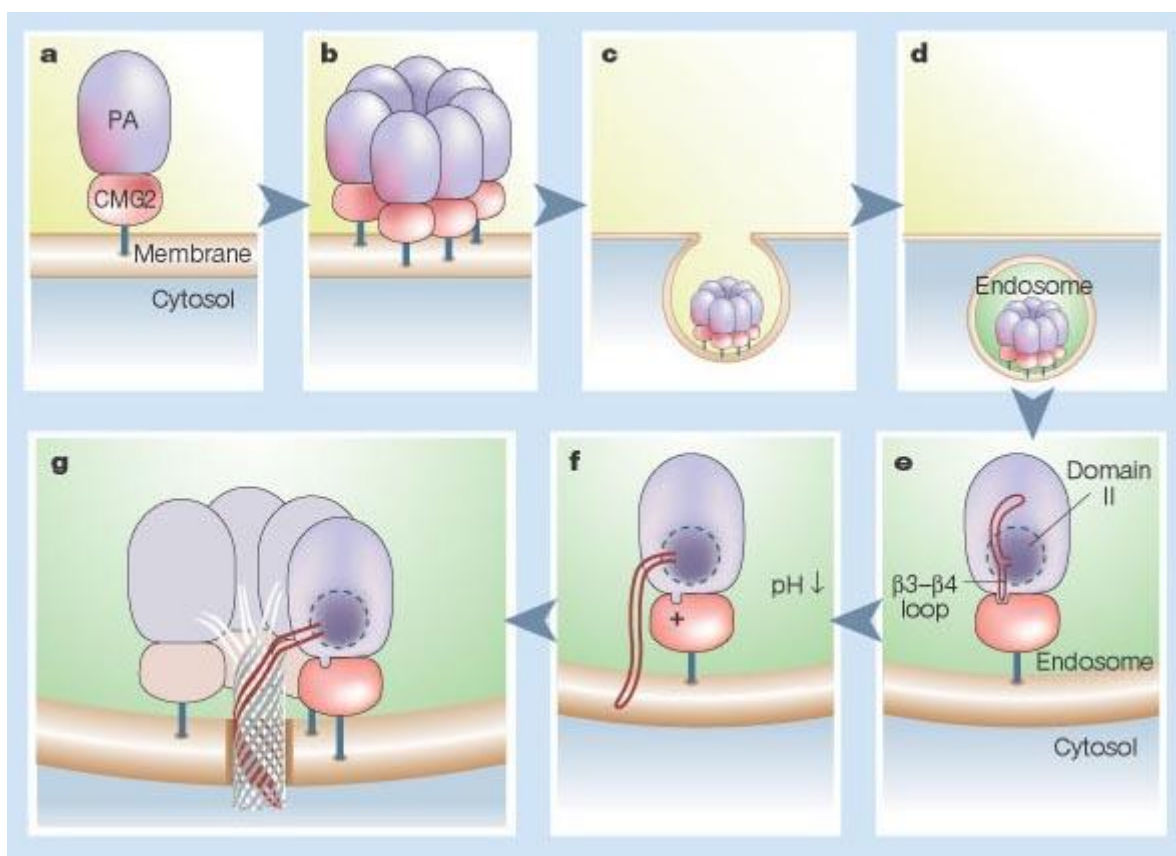


Figuur 9. De aanhechting, entree van PA, LF en EF (aangepast van Mock *et al*)

(Pavan et al., 2011)

Figuur 10 laat nog specifiek zien hoe LF en EF in het cytosol terecht komen. Vooral de pH daling is belangrijk.

PA 63 kD vormt samen met 6 andere gelijke eenheden een hetamerisch complex, met een porie. Dit is PA^{7mer}, waaraan LF en EF zitten (a en b). Het PA^{7mer} komt vervolgens in een endosoom terecht (c en d). PA 63 kD hecht zich met een lus van domein II ($\beta 3$ - $\beta 4$) aan het CMG2 oppervlak. In het endosoom daalt de pH, waardoor het CMG2 gedeelte positief wordt (f). Hierdoor wordt de $\beta 3$ - $\beta 4$ lus afgestoten, waardoor het domein II deel een grote structuurverandering ondergaat. De lus en naburige strengen keren zich af en gaan zich verbinden met het endosomale membraan (g). Bij elke PA-CMG2 verbinding vindt dit plaats, waardoor er een tunnel ontstaat. Door deze tunnel kunnen LF en EF op weg gaan naar het cytosol van de gastcel (Bann & Hultgren, 2004).



Figuur 10. Entree van LF en EF in het cytosol (Bann & Hultgren, 2004)

PA = PA 63 kD

CMG2 = ANTRX2

Domain II = Domein II, een complexe biochemische structuur waaraan PA 63 kD gehecht zit, samen met LF en EF.

$\beta 3$ - $\beta 4$ -loop = $\beta 3$ - $\beta 4$ -lus, onderdeel van de tunnel, waarlangs LF en EF zich naar het cytosol kunnen verplaatsen.

5.3 De biochemische processen in de geïnfecteerde cel

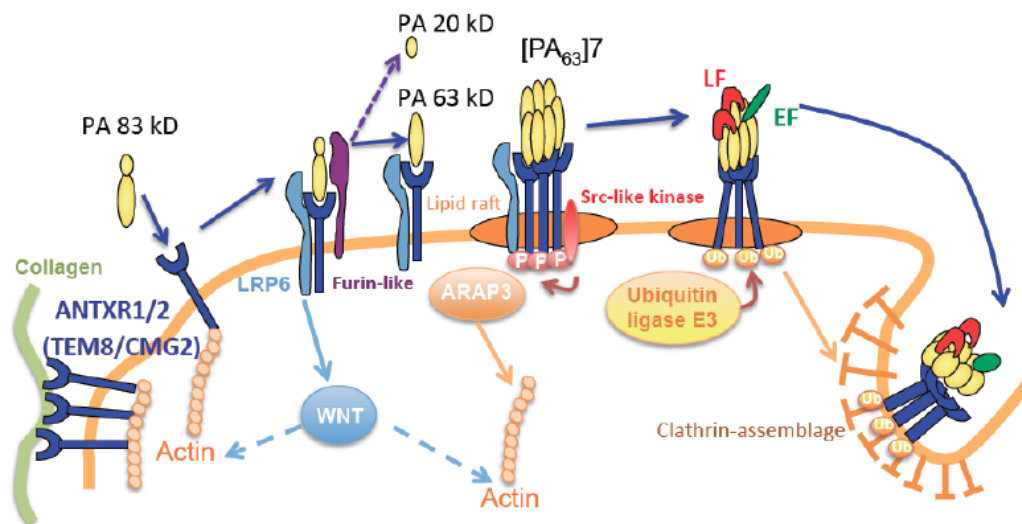
5.3 1. Inleiding

LF is een zink metalloprotease, dat de meeste mitogen-actieve proteïne kinase kinases (MAPKKs), of Meks afsplitst, wanneer dat door PA aan het cytosol wordt geleverd. Het inactiveren van drie belangrijke Meks, extracellulaire signaal gereguleerde kinases, d-Jun N-terminal kinases en p38 heeft beschadiging van diverse cellulaire processen tot gevolg. Bijvoorbeeld celdeling, celdifferentiatie, celreactie op stress en apoptose (Weiner & Glomski, 2012).

EF kenmerkt zich door adenylate cyclase activiteit, omdat het CaM nodig heeft om te kunnen werken. De werking van CaM kan worden vergeleken met een Ca^{2+} sensor. In aanwezigheid van CaM wordt ATP omgezet in cAMP. Daarna ontstaat zwelling van het cytosol (Weiner & Glomski, 2012).

5.3.2. De aanhechting van PA, EF en LF en de daaropvolgende reacties in de cel

In figuur 10 is ook te zien op welke wijze de aanhechting plaatsvindt aan de gastheercel. Het bijzondere van deze figuur is, dat ook de invloed op het cytoskelet te zien is. Een onderdeel van het cytoskelet is actine. Als dit wordt aangetast, dan komen de structuur en het functioneren van de gastheercel in gevaar. Links begint de aanhechting aan het membraan via ANT XR1/2(TEM8/CMG2). TEM8 lijkt een directe link te hebben met het cytoskelet, omdat een hechting aan actine is te zien. Verder studies zullen meer inzicht hierin moeten geven. Bij de splitsing van PA 83 kD in PA 63 kD en PA 20 kD zijn het co-enzym LRP6 en furine bij betrokken. Mogelijk is de aanwezigheid van LRP6 celspecifiek. Wel is aangetoond dat als LRP6 aanwezig is, deze met de anthrax toxine receptoren samenwerkt en de controle overneemt van de WNT signaling pathway. De WNT signaling pathway heeft invloed op de werking van β -catenin. β -catenin heeft invloed op de werking van de kern, het cytoskelet en het cytosol (Lodish et al., 2007). In figuur 11 is dit terug te vinden in de pijlen die aangeven, dat WNT invloed heeft op actine (onderdeel van het cytoskelet). In figuur 11 is ook te zien dat na LRP6 het enzym furine een rol gaat spelen. Dit enzym helpt bij de splitsing van PA 83 kD in PA 20 kD en PA 63 kD. De anthrax-toxinen beïnvloeden ook de Src-like kinase, waardoor er fosforisatie van CMG2 en TEM-8 plaatsvindt, met als gevolg dat de interne celstructuur wordt aangetast. Dit stimuleert de opname van de toxines in de cel. PA-ANTXR oefent invloed uit op ARAP3, waarbij ARAP3 weer invloed heeft op actine. Ubiquitine ligase E3 staat voor een proces, waarbij eiwitten worden afgebroken (Lodish et al., 2007). Via de Clathrin-assemblage worden endosomen gevormd (Lodish et al., 2007), waar na de pH daling LF en EF in het cytosol terecht komen (zie ook figuur 10) (Trescos & Tournier, 2012).



Figuur 11. Aanhechting van PA, EF en LF en de daaropvolgende reacties in de cel
(Trescos & Tournier, 2012)

5.3.3 De biochemische reacties in de cel na entree van LF en EF

In figuur 12 wordt nog gedetailleerder aangegeven op welke wijze de hechting van PA₈₃ plaatsvindt, en hoe LF en EF in het cytosol terechtkomen. De aanhechting van PA₈₃, en de effecten van de aanwezigheid van LF en EF in het cytosol zullen afzonderlijk worden beschreven, waarna een algemene conclusie zal worden getrokken. De processen die hier staan weergegeven, zijn afkomstig van onderzoeken in dieren, in vitro (Moayeri & Leppla, 2009).

5.3.3.1 De hechting van PA₈₃ en het vrijkomen van LF en EF in het cytosol

In figuur 11 wordt links bovenaan de hechting van PA₈₃ weergegeven. Te zien is dat PA₈₃ zich hecht aan ANT XR 1/2 (CMG2, TEM2), waarna m.b.v. furine de splitsing van PA₈₃ in PA₂₀ en PA₆₃ tot stand komt. Deze splitsing maakt het mogelijk dat LF en EF zich gaan hechten en door de Clathrin assemblage in een endosoom terecht komen. Door de pH-daling komen LF en EF nu vrij in het cytosol (zie ook figuur 10) (Moayeri & Leppla, 2009).

5.3.3.2 De werking van EF

Vanuit het midden naar rechts toe staat de werking van EF weergegeven. EF heeft invloed op de werking van cAMP, omdat PKA/CREB en Epac1/Rap1 worden beïnvloedt. Dit leidt tot aantasting van de werking van de monocytische cellen, de T-cellen, de neutrofielen, de trombocyten en de endotheliale cellen. Dit is te vinden in het witte blokje rechtsmidden (Moayeri & Leppla, 2009).

De monocytische cellen worden geremd in de cytokine productie. Cytokines spelen een belangrijke rol bij de groei en differentiatie van cellen, vooral van de bloedcellen en de cellen van het immuunsysteem (Lodish et al., 2007). Ook wordt de fagocytose werking geremd, zie paragraaf 4.4.1.

T-cellen worden geremd in hun activiteiten. Ze kunnen hierdoor hun functie in het immuunsysteem niet of niet meer voldoende uitoefenen. Ze worden ook geremd in hun reactie op chemotaxis. Hierdoor wordt de reactie op chemische prikkels geremd. Ook wordt de werking van cytokine geremd (zie monocytische cellen) (Lodish et al., 2007). Verder worden de T-cellen gestimuleerd in de Th2-subtype differentiatie. Hierdoor zal hun werking in het immuunsysteem niet meer optimaal zijn.

Neutrofielen worden geremd in hun fagocytose werking en in de vermindering van de NADPH oxidase activiteit. NADPH oxidase stimuleert normaal gesproken de productie van het superoxide ion (O₂⁻). Bacteriën zijn hier gevoelig voor (Tonello & Zorretta, 2012), en *Bacillus anthracis* is in staat de werking van de superoxide te verminderen (zie ook paragraaf 4.4.2).

Trombocyten (bloedplaatjes) worden geremd in het samenklonteren, waardoor de bloedstolling verstoord raakt. Tot slot kennen de endotheliale cellen een toename in hun transendotheliale resistentie, waardoor de bloedsomloop verstoord raakt (Campbell et al., 2011).

5.3.3.3 De werking van LF

Vanuit het midden van figuur 12 naar links toe staat de werking van LF weergegeven. Het tast de werking van de MAPKKs of Meks aan. Dit is ook kort besproken in par 5.2. LF zal de N-terminus, die van belang is voor de start van eiwitsynthese op het ribosoom, afsplitsen van de Meks. De N-terminus is van belang voor de start van eiwitsynthese op het ribosoom. Hierdoor raakt ook de p38, SAPK/JNK en de ERK1/2 pathway verstoord (Moayeri & Leppla., 2009).

Door de figuur te volgen komt uiteindelijk in beeld dat p38, SAPK/JNK en ERK 1/2 tezamen de monocytic cellen, de neutrofielen, de T-cellen, de algemeen celtypes, de B cellen, de trombocyten, en de endotheliale cellen aantasten in hun functioneren. Dit is de vinden in het witte blokje linksonderaan.

Zo is te zien dat in de monocytic cellen remming plaatsvindt van de differentiatie van de cellen, van de cytokine productie, van de fagocytose werking en van de anti-bacteriële functie en van de antigen-uiting. Dit is ook al geschreven bij de werking van EF in paragraaf 5.3.3.2.

Costimulatiefuncties hebben betrekking op de werking van het immuunsysteem. De werking van het immuunsysteem wordt hierdoor geremd (Lodish et al., 2007).

De neutrofielen worden geremd of juist gestimuleerd in de NADPH oxidase activiteit en ze spelen een rol bij de remming van chemotaxis. Dit is in paragraaf 5.3.3.2 besproken. T-cellen worden geremd in hun werking, in hun reactie op chemotaxis en op cytokine respons. Dit is in paragraaf 5.3.3.2 besproken.

Bij het algemene celtype wordt de glucocorticoïd receptor geremd. Hierdoor raakt de ontwikkeling, het metabolisme van de cel en de werking van het immuunsysteem verstoord (Lodish et al., 2007). In B- cellen wordt de IgM-productie geremd. Hierdoor raakt de productie van dit type antistof verstoord, waardoor het geen bijdrage meer kan leveren aan de werking van het immuunsysteem (Lodish et al., 2007).

Bij de trombocyten wordt het samenklonteren tegengegaan. Dit is ook besproken in paragraaf 5.3.3.2. Bij de endotheliale cellen raakt de barrièrefunctie verloren en wordt de cytokine respons geremd. De werking van cytokine is ook besproken in paragraaf 5.3.3.2.

De ERK1/2 pathway heeft ook nog een eigen specifieke werking. Zoals het groene blokje in het midden aantoont. Het stopt de celdeling en celsplitsing van endotheliale cellen, neutrofielen, B en T-cellen en epitheliale cellen. Het is nog niet duidelijk of dit ook leidt tot apoptose van endotheliale en epitheliale cellen (Moayeri, M. & Leppla, S.H., 2009).

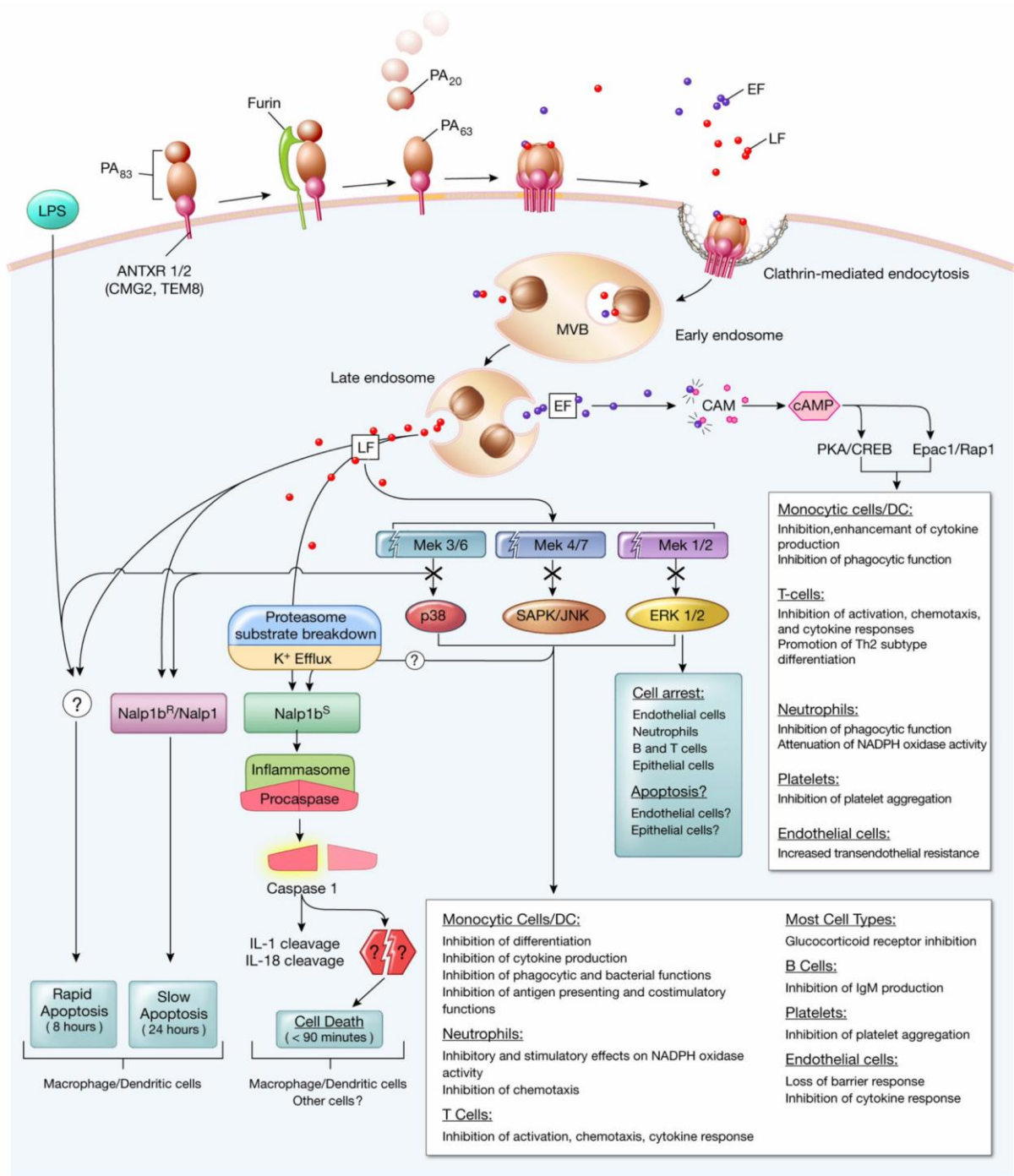
Er is ook een directe lijn links aangegeven van LF, mogelijk via p38, SAPK/JNK en ERK1/2, naar de invloed op de afbraak van protease substraat. Daarbij is ook K^+ Efflux betrokken. De route die dan volgt via Nalp1b^S, leidt tot inflammasome/procaspase, caspase 1, IL-1 splitsing en IL-18 splitsing. Er zijn nog onduidelijkheden, maar uiteindelijk leidt dit tot de celdood binnen 90 minuten van in ieder geval de macrofagen en de dendritische cellen (Moayeri & Leppla, 2009).

LF zal ook NALP1b^R/NALP1 beïnvloeden, zoals links onderaan wordt weergegeven. Dit leidt tot een langzame apoptose (zelfdoding van de cel) van macrofagen, dendritische cellen en mogelijk andere cellen (Moayeri & Leppla, 2009).

LPS (linksbovenaan), een endotoxine van Gram-negatieve bacteriën, kan in samenwerking met LF een snelle apoptose van macrofagen en dendritische cellen veroorzaken. Het mechanisme daarbij is nog niet bekend (Moayeri & Leppla, 2009).

5.3.3.4 Algemene conclusie

PA₈₃ kan zich hechten aan AMTXR1/2 (CMG2, TEM8), daarna volgt de splitsing in PA₂₀ en PA₆₃, waarna LF en EF zich kunnen hechten. Na de pH daling komen LF en EF vrij in het cytosol terecht. Hierdoor komen diverse reacties tot stand. Daarbij wordt het immuunsysteem (B- en T-cellen, neutrofielen), het bloedvatstelsel (trombocyten en endotheliale cellen) en het hormoonstelsel (glucocorticoïde receptoren) aangetast. Ook wordt de apoptose van cellen gestimuleerd. Uiteindelijk raakt de werking van het gehele lichaam sterk verstoord.



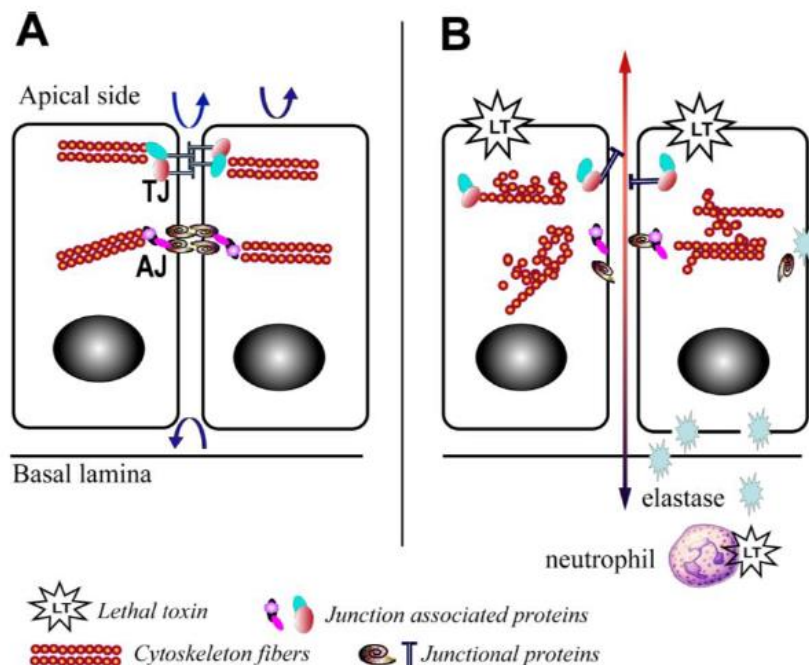
Figuur 12. Effecten van de aanwezigheid van LF en EF in het cytosol

(Moayeri & Leppla, 2009)

5.3.4 Aantasting van de onderlinge celstructuur door LT

Epitheliale en endotheliale weefsels kennen verschillen in opbouw. Tezamen zijn ze een barrière voor indringers. Daarbij zijn tussen het epitheliale en endotheliale weefsel verschillende, aan elkaar klevende, verbindende complexen aanwezig. Dit zijn de zgn. tight junction (TJ) en adherens junction (AJ). Deze TJ en AJ bezitten transmembrane eiwitten, die naastgelegen cellen aan elkaar verbinden. En daarbij ook een interne verbinding met het actine cytoskelet aangaan. TJ's zijn meestal apicaal aanwezig en zijn verantwoordelijk voor het dichtens van de intercellulaire ruimte tussen de cellen. Ze reguleren ook het transport van selectief paracellulaire ionische oplossingen, en ze handhaven de celpolariteit. AJ's zijn gevormd door cadherin-catenin interacties en zijn belangrijk voor de mechanische verbinding tussen naburige cellen. TJ's en AJ's zijn bovendien belangrijk in de regulatie van cellulaire vermenigvuldiging en in de polarisatie en differentiatie van cellen (Campbell et al., 2011).

In figuur 13 wordt de werking van LT op TJ en AJ uitgelegd.



Figuur 13. Werking van LT op TJ en AJ

(Xie et al., 2011)

In situatie A is er geen probleem. Situatie B laat zien dat LT verbonden is aan de cel. Daardoor laten TJ's en AJ's los, waardoor het cytoskelet geheel verstoord raakt en neutrophyl elastase zijn gang kan gaan wat tot celdood leidt (via inflammatoire = ontstekingsreactie) (Xie et al., 2011).

5.3.5 De gevolgen van de aantasting van het epitheliale en endotheliale weefsel

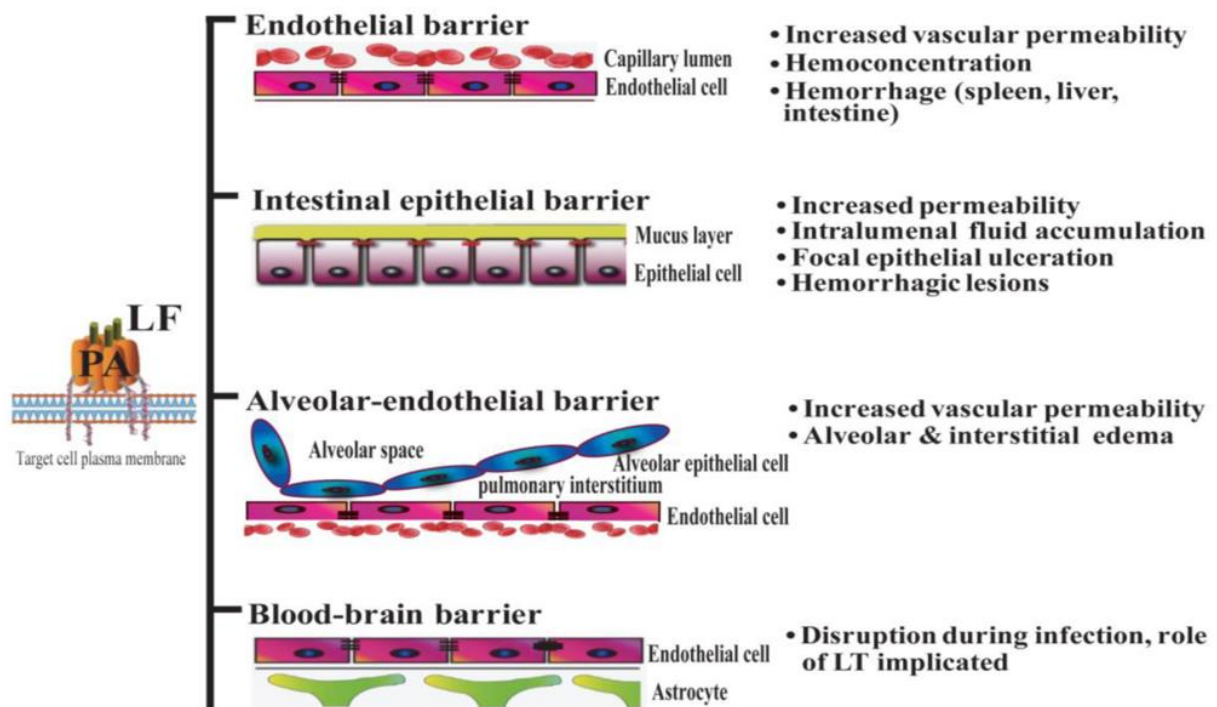
In paragraaf 5.3.3 is voor LF en EF beschreven wat de biochemische reacties kunnen zijn na entree in de cel. In voorgaande paragraaf 5.3.4 is uitgelegd op welke wijze LT (de PA-LF verbinding) de onderlinge celstructuur aantast. Daardoor kunnen diverse epitheliale en endotheliale weefsels zodanig aangetast raken, dat de barrière vernietigd wordt. LF en EF kunnen in het cytoplasma terecht komen en hun desastreuze werk verrichten. In deze paragraaf wordt hier dieper op ingegaan. De aantasting van diverse barrières en de gevolgen daarvan staan centraal. Figuur 13 is hierbij behulpzaam. Alles staat weergegeven in figuur 14.

In figuur 14 wordt links de PA-LF verbinding afgebeeld (dit is LT). LT kan zowel endotheliale als epitheliale barrières aantasten. Na endocytose komt LF vrij in het cytoplasma, waarna LF zijn werk verder kan verrichten.

Bovenaan staat weergegeven dat de endotheliale weefselbarrière wordt aangetast. Hierdoor neemt de vasculaire permeabiliteit toe, de hemoconcentratie wordt beïnvloed en er ontstaan bloedingen in de milt, de lever en de darmen. Algemeen kan gezegd worden dat het bloedvatenstelsel behoorlijk aangetast raakt (Xie et al., 2011).

De intestinale epitheliale weefselbarrière wordt ook aangetast. Het darmepitheel raakt hierdoor beschadigd. Het gevolg is dat de permeabiliteit toeneemt dat er een ophoping van intralumenale vloeistof optreedt, en dat er plaatselijk epitheelaantasting plaatsvindt, waardoor er lokale bloedingen ontstaan (Xie et al., 2011).

Het aantasten van de alveolaire-endotheliale weefselgrens verstoort de barrière tussen longblaasjes en het haarvatenstelsel. Er vindt een toename in de vasculaire permeabiliteit plaats en er ontstaat alveolair en interstitieel oedeem. Tot slot zorgt LT, bij het passeren van de bloedgrens tussen de hersenen en de rest van het lichaam, voor het ontregelen van hersenenfuncties (Xie et al., 2011).



Figuur 14. Effect van LT op verschillende barrières

(Xie et al., 2011)

5.3.6 De gevolgen van de aantasting van het epitheliale en endotheliale weefsel op diverse lichaamsystemen

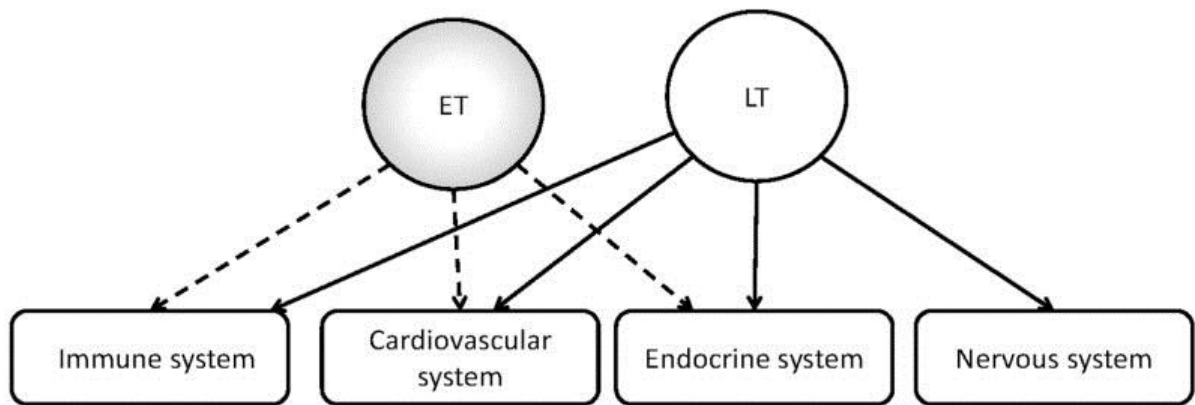
In figuur 14 wordt heel specifiek weergegeven wat de effecten van edema toxine (ET) en lethale toxine (LT) zijn op de geïnfecteerde. De doorbroken lijn bij ET geeft weer wat het effect van ET op het lichaam nog niet volledig duidelijk is. Tot nu toe zijn het vermoedens die nog verder onderzoek vereisen. Figuur 15 laat mooi de verschillende effecten zien op het immuunsysteem, het cardiovasculaire systeem, het endocriene systeem en het zenuwstelsel. Verder geven de verschillende type pijlen aan dat er zowel een remming als een stimulans van het genoemde effect is. Veel van de effecten zijn ook besproken bij figuur 12.

Bacillus anthracis staat bekend om de vernietiging van het immuunsysteem (zie links figuur 15). Daarvoor is in ieder geval LT verantwoordelijk en mogelijk ook ET. De effecten zijn terug te vinden als (stimulatie of remming van) chemotaxis, stimulering van apoptose en pyroptosis, remming op de bacteriedoding, remming van pro-inflammatoire cytokine productie, dysregulatie van cytokine cross-talk en remming van T/B celproliferatie (zie paragraaf 5.3.3) (Lowe & Glomski, 2012).

Links in het midden staat het cardiovasculaire systeem vermeld. LT en vermoedelijk ook ET verminderen de cardiac output, stimuleren de vasculaire permeabiliteit, stimuleren de hypotensie responsen en stimuleren de doorgang van *Bacillus anthracis* door de bloedbarrière bij de hersenen (zie paragraaf 5.3.3 en paragraaf 5.3.4) (Lowe & Glomski, 2012).

Rechts in het midden staat het endocriene systeem. Daar heeft LT en mogelijk ook ET effect op. Er vindt een remming plaats van glucocorticoïde receptor activatie, een stimulering van LT sensitiviteit voor supplementaire glucocorticoïden en adrenalectomieën en een toename in corticosterone serum levels (zie paragraaf 5.3.3) (Lowe & Glomski, 2012).

Rechts staat het effect weergegeven op het zenuwstelsel. Het algemene effect is dat er een daling is in de EEG-activiteit (elektrische) activiteit van de hersenen), een abnormale EKG activiteit (elektrische activiteit van de hartspier) afname in phrenic zenuwpuls (dit is de belangrijke zenuw aan de linker en rechterzijde van de nek, die informatie doorgeeft van het lichaam naar de hersenen en omgekeerd, en belangrijk is voor het aansturen van de ademhaling) en toename in het sympathische zenuwimpuls (afnemend in de tijd). Hierdoor zullen spieren sterk reageren, waardoor bijvoorbeeld het hart sneller kan gaan kloppen en de ademhaling sneller kan plaatsvinden (Lowe & Glomski, 2012).



General effects

- ↓ Chemotaxis
- ↑ apoptosis and pyroptosis in some strains
- ↓ bacterial killing
- ↓ pro-inflammatory cytokine production
- Dysregulation of cytokine cross-talk
- ↓ T/B cell proliferation

General effects

- ↓ Cardiac output
- ↑ vasculature permeability
- ↑ hypoxia response genes
- ↑ internalization of *B. anthracis* by blood-brain barrier

General effects (LT only)

- ↓ Glucocorticoid receptor activation
- ↑ LT sensitivity with supplemental glucocorticoids, adrenalectomies
- ↑ in corticosterone serum levels

General effects (LT only)

- ↓ EEG activity
- Abnormal EKG activity
- ↓ phrenic nerve pulse
- ↑ sympathetic nerve discharge, declines over time

Figuur 15. Effect van ET en LT op diverse systemen (Lowe & Glomski , 2012)

Conclusie

In onderstaande punten worden uitgelegd welke processen verantwoordelijk zijn voor de infectie van *Bacillus anthracis* bij zoogdieren.

Start infectie *Bacillus anthracis*?

Bacillus anthracis is een bacterie die als spore verschillende manieren van infectie kent. De start is via de daadwerkelijke entree in het lichaam, waarbij de entree mogelijk plaatsvindt via het “Trojaanse paard” model of via het Jailbreakmodel (Weiner & Glomski, 2012). De entree van *Bacillus anthracis* kent drie type besmettingen, namelijk de cutane anthrax, de respiratoire of inhalatie-anthrax en de gastro-intestinale anthrax. Daarna kan de entree van de spore worden geëlimineerd door verschillende immuunsysteemcellen (Tonello & Zornetta, 2012). Gebeurt dit niet, dan zal de infectie in de rest van het lichaam plaatsvinden. Daarvoor gaat *Bacillus anthracis* zich via de lymfeknopen vermeerderen. Vervolgens gaan ze als vegetatieve cellen verder het lichaam in.

De biochemische processen in het lichaam

Ten eerste is van belang om te beseffen dat *Bacillus anthracis* de virulente factoren bezit. Virulente factoren zijn de exotoxinen en de capsule. De exotoxinen worden door pXO1 gemaakt en bestaan uit PA₈₃ en LF en EF. pXO2 bezit de code voor de aanmaak van de capsule, waardoor *Bacillus anthracis*, als spore, in staat is na het overlijden van de geïnfecteerde zeer langdurig en onder extreme omstandigheden te overleven (Weiner & Glomski, 2012).

Ten tweede is van belang om te beseffen dat PA₈₃ zich hecht aan ANTRX1 (TEM8) en ANTRX2 (CMG2) van het celmembraan. Aan dit PA₈₃ - ANTRX1(TEM8) ANTRX2(CMG2) complex hechten zich LF en EF (Trescos & Tournier, 2012).

Ten derde is het belangrijk te beseffen dat deze EF en LF belangrijk zijn voor de verder beïnvloeding van biochemische processen in het lichaam. Via endocytose komen EF en LF vrij in het cytoplasma. Daarna gaan EF en LF de werking van het immuunsysteem, het bloedvatstelsel, het hormoonstelsel en het zenuwstelsel verstoren. Ook wordt apoptose gestimuleerd.

Tot slot kan het lichaam van de geïnfecteerde niet meer normaal functioneren (Moayeri & Leppla, 2009; Xie et al., 2011; Lowe & Glomski, 2012; Pavan et al., 2011; Bann & Hultgren, 2004).

Discussie

De wijze van besmetting

Bacillus anthracis kent drie typen van besmetting. Namelijk de cutane anthrax, de respiratoire of inhalatie-anthrax en de gastro-intestinale (RIVM, 2011). Niet elke besmetting is dodelijk. De route van inhalatie is veel dodelijker dan de andere routes. Coggeshall et al. (2013) bieden mogelijk een antwoord op de vraag waarom de besmetting via inhalatie dodelijker is. Dit is verwerkt in het sepsismodel, die in bijlage 3 vermeld staat. Een boeiende bron, die echter niet meer volledig zal worden geïntegreerd in deze literatuurstudie. Het sepsismodel is nog hypothetisch. Vervolgonderzoek zal meer duidelijkheid moeten geven of dit model correct is.

De wijze van infectie en de daaropvolgende biochemische processen

De infectie begint met het binnendringen van de bacterie in het lichaam. Het feitelijke proces rondom het binnendringen van het lichaam is nog niet volledig duidelijk. Dit kan via het “Trojaanse paard” model of via het Jailbreakmodel. Daarover is maar één literatuurbron gevonden. Ook kan het immuunsysteem de spore van *Bacillus anthracis* elimineren. Hiervan is maar één literatuurbron gevonden. Het artikel van Coggeshall et al. (2013) biedt mogelijk meer antwoord. Dit artikel is te vinden in bijlage 3. Te lezen is dat de ook het type besmetting van invloed kan zijn op de kans op genezing. De besmetting via de huid en via het maag-darmkanaal geeft sneller lichamelijke reacties, waardoor de patiënt sneller medische hulp zoekt en verkrijgt in de vorm van antibioticum. Dit antibioticum wordt zo snel toegediend, dat de infectie van *Bacillus anthracis* in dit stadium juist wordt bestreden en deze zich niet kan verspreiden door het lichaam. Hierdoor is de kans om de infectie te overleven zeer groot. Bij de inhalatiebesmetting zijn de lichamelijke reacties milder. Hierdoor zoekt de patiënt niet op tijd hulp. *Bacillus anthracis* heeft zich dan al veel meer verspreid door het lichaam. Het toedienen van antibioticum is dan dikwijls te laat, waardoor de bacterie het immuunsysteem volledig kan verstoren en de strijd wint.

Wel is duidelijk dat de aanhechting aan het celmembraan van wezenlijk belang is om LF en EF in contact te brengen met de cel. Daarbij is belangrijk dat de exotoxine PA₈₃ zich kan hechten aan dit celmembraan. Deze exotoxine vormt samen met ANTRX1(TEM8) ANTRX2(CMG2) een complex. (Weiner & Glomski, 2012). Hieraan gaan LF en EF zich hechten. Door een pH-daling komen LF en EF via endocytose vrij in het cytoplasma. Vervolgens vinden vele biochemische processen plaats. Deze staan in meerdere literatuurbronnen beschreven, waarbij onderzoekers steeds meer inzicht hebben verkregen in deze biochemische processen. De aanwezigheid van LF en EF bepalen feitelijk de reacties van het lichaam. Het komt er op neer dat het immuunsysteem, het bloedvatstelsel, het hormoonstelsel en het zenuwstelsel in hun functioneren behoorlijk aangetast raken. De rol van LF is daarbij het meest duidelijk; de rol van EF bij het verstoren van het immuunsysteem en het hormoonstelsel nog niet (zie figuur 15). Ook is de rol die LF heeft in de apoptose van cellen nog niet volledig duidelijk (zie figuur 12).

In dit onderzoek is echter niet naar voren gekomen wat het verschil is tussen de verschillende type besmettingen en de mate waarin de biochemische processen van het immuunsysteem, het bloedvatstelsel, het hormoonstelsel en het zenuwstelsel verstoord raken. Daarover is geen literatuur gevonden. Ook hierbij wordt verwezen naar bijlage 3. Dit is de extra literatuurbron, die hier mogelijk wel meer inzicht in geeft, maar verder niet volledig zal worden geïntegreerd in het verslag.

De rol van LF is het meest duidelijk. LF tast het immuunsysteem, het bloedvatenstelsel, het hormoonstelsel en het zenuwstelsel aan. De rol van LF bij de apoptose van cellen is nog niet volledig duidelijk. Ook de rol van EF is nog niet geheel duidelijk.

Daarom zal hier een nieuwe hypothese worden gesteld: de inhalatie-anthrax is dodelijker omdat de infectie met *Bacillus anthracis* te laat wordt ontdekt, waardoor er te laat antibiotica wordt toegediend en de geïnfecteerde te veel uitval heeft van lichamelijke functies. Wellicht is het de moeite waard om hier vervolgonderzoek naar te doen.

Literatuurlijst

Bann, J.G. & Hultgren, S.J. (2004). Structural biology: Anthrax hijacks host receptor. *Nature* **430**, 843-844, doi:10.1038/430843a

Campbell, N., Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., et al. (2011). *Biology*. San Francisco, California, USA: Pearson Benjamin Cummings.

Coggeshall, K.M., Lupu, F., Ballard, J., Metcall, J.P., James, J.A., Farris, D., Kurosawa, S. (2013). The sepsis model: an emerging hypothesis for the lethality of inhalation anthrax. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* p 914-920. doi: 10.1111/jcmm.12075

Goel, A.K. (2015). Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World Journal of Clinical Cases*. doi: 10.12998/wjcc.v3.i1.20

Lincoln R.E., et al. (1965). Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J. Infect. Dis* 115: 481-494

Liu, H., Bergman, N.H., Thomason, B., Shallom, S., Hazen, A., ... Crossno, J.(2004). Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore. *Journal of Bacteriology* p 164-178. doi:10.1128/JB.186.1.164-178.2004

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M. Scott, M.P., ... Bretsher, A. (2007) *Molecular Cell Biology*. New York, W. H. Freeman and Company

Lowe, D.E. & Glomski, I.J. (2012). Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. doi: 10.3389/fcimb.2012.00076

Madigan, M., Martinko, J. Stahl, D. Clark, D. (2012). *Brock's Biology of Microorganisms* (13 ed.). San Francisco, USA: Pearson Education Inc.

[Miltvuurbosje] [foto] [2013]. Overgenomen van <http://www.gezondheidenco.nl/65531/miltvuurgifspoor-uit-het-verleden-door-miltvuurbosjes/>

Moayeri, M. & Leppla, S.H. (2009). Cellular and Systemic Effects of Anthrax Lethal Toxin and Edema Toxin. *Mol Aspects Med.* 30 96) 439-455 doi: 10.1016/j.mam.2009.07.003

Pavan, M.E., Pettinari, M.J., Cairo, F., Pavan, E.E., Cataldi, A.A.(2011). *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología* 43: 294-310.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (2011, Mei). LCI-richtlijn Anthrax.

Ross, J.M. (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J. Pathol. Bacteriol.* 73-9

Tonello, F. & Zorretta, I. (2012) *Bacillus anthracis* Factors for Phagosomal Escape. *Toxins* 2012, 4, 536-553 doi: 10.3390/toxins4070536

Trescos, Y. & Tournier, J. (2012). Cytoskeleton as an Emerging Target of Anthrax Toxins. *Toxins* 2012, 4, 83-97. doi: 10.3390/toxins4020083

Weiner, Z.J. & Glomski, I.J. (2012). Updating Perspectives on the Initiation of *Bacillus anthracis* Growth and Dissemination through Its Host. *Journals American Society for Microbiology*. doi:10.1128/IAI.06061-11

Xie, T., Auth, R.D., Frucht, D.M. (2011). The Effects of Anthrax Lethal Toxin on Host Barrier Function. *Toxins* 2011, 3, 591-607. doi:10.3390/toxins3060591

Bijlagen

Bijlage 1 Anthrax-blunder Amerikaanse leger veel groter dan gedacht

WOENSDAG 3 JUNI 2015

BUITENLAND

Laboranten van het Amerikaanse leger hebben per ongeluk levende anthraxbacteriën gestuurd naar zeker 51 laboratoria in binnen- en buitenland. Dat heeft het Pentagon bekendgemaakt.

Daarmee blijkt de blunder ruim twee keer zo groot als eerst werd aangenomen. Vorige week meldde het Pentagon nog dat 24 laboratoria de gevaarlijke bacteriën hadden gekregen. Er hadden inactieve en dus ongevaarlijke anthraxmonsters gestuurd moeten worden.

Zuid-Korea

Vorige week donderdag werd bekend dat 22 medewerkers van een Amerikaanse luchtmachtbasis in Zuid-Korea uit voorzorg moesten worden behandeld tegen de mogelijke gevolgen van contact met anthrax (miltvuur). Zij hadden de levende anthraxmonsters gekregen van een laboratorium in de staat Utah.

Volgens het Pentagon waren de gevaarlijke monsters ook naar laboratoria in negen Amerikaanse staten gestuurd. Nu blijkt de anthrax naar laboratoria in zeventien staten te zijn gezonden, en behalve naar Zuid-Korea ook naar labs in Australië en Canada.

Biologische wapens

De monsters worden gebruikt voor onderzoek naar biologische wapens.

Volgens het Pentagon is niemand geïnfecteerd geraakt met miltvuur door de fout. Een besmetting met miltvuur kan zonder de juiste behandeling dodelijk zijn. Ook zijn er geen aanwijzingen dat de fout opzettelijk is gemaakt, liet het Pentagon vanavond weten.

(NOS.(2015) Anthraxblunder Amerikaanse leger veel groter dan gedacht(Persbericht). Geraadpleegd op <http://nos.nl/artikel/2039372>)

Bijlage 2 Onderzoeksplan Meesterstuk

Inleiding

Dit onderzoek gaat over het mechanisme waardoor *Bacillus anthracis* na infectie vaak dodelijk is voor mens en dier. *Bacillus anthracis* kan tientallen jaren overleven in de bodem, onder extreme omstandigheden. Dit komt omdat het daar als spore overleeft. Komt deze spore echter weer in contact met mens en dier, dan is deze veelal dodelijk. De wijze van infectie is daarbij wel van belang. Een te late diagnose zorgt ervoor dat het slachtoffer feitelijk geen overlevingskans meer heeft. De toxines die geproduceerd zijn, vernietigen vitale organen. De mens of het dier overlijdt, waarna de bacterie weer in sporevorm zal moeten overleven, totdat er weer een kans is op besmetting.

De infectie met sporen van *Bacillus anthracis* is dus vaak dodelijk, maar wat voor mechanisme schuilt daarachter? Er zijn daarbij diverse biochemische processen die een rol spelen. Ik wil mij verdiepen in deze biochemische processen tot in de cel en de dodelijke effecten ervan. Verder bieden deze biochemische processen mogelijk kansen om de infectie te bestrijden.

De onderzoeksvraag luidt: Welke processen zijn verantwoordelijk voor de infectie door *Bacillus anthracis* bij mens en dier?

Deelvragen die ik wil stellen zijn:

1. Wat voor type bacterie is *Bacillus anthracis*?
2. Op welke manieren vindt de infectie plaats?
3. Hoe werkt na de infectie het biochemische proces?
4. Welke delen van het lichaam zijn daarbij kwetsbaar en waarom?
5. Op welke wijze kun je de bacterie bestrijden met antibiotica?

Onderzoeksmethode

1. Voorbereiding: lezen van het materiaal via ELO. Digitale cursus volgen. Onderwerp bepalen.
2. Informatie verzamelen. Wat is *Bacillus anthracis* voor type bacterie. Verspreiding over de wereld. Plaats binnen de *Bacillus*groep. Hoe verloopt de infectie en waarom zo dodelijk?
3. Antwoorden op de deelvragen vinden. Bronnen: via Pubmed artikelen zoeken. Boeken van de opleiding. Globaal lezen, interessante zaken wel alvast wel noteren.
4. Welke bronnen wil ik echt gebruiken voor het beantwoorden van de vragen. Zijn ze wel allemaal geschikt? Heb ik genoeg literatuur gevonden om de antwoorden te geven op de vragen?
5. De uitgekozen informatiebronnen echt gaan lezen.
6. Informatie verwerken in meesterstuk
7. Samenvatting geven het meesterstuk, literatuurlijst maken volgens APA-norm, lay-out van het meesterstuk volledig afmaken.

Taak	Einddatum	Schatting van benodigd
------	-----------	------------------------

		aantal uren
Onderzoeksplan	19 jan 2015	8
Algemene informatie verzamelen	25 jan	8
Deelvragen maken en informatie verzamelen	1 febr	10
Selectie informatie	8 febr	5
Informatiebronnen doornemen	15 febr	20
Opzet meesterstuk af, contactdag Zwolle	5 mrt	10
Informatie verwerken in meesterstuk	26 mrt	45
Samenvatten, evalueren, bijstellen, lay-out inleveren	2 april	6
Totaal:		112 (4EC)

Motivatie en leerdoelen

In mijn provincie is een groot infrastructureel project onlangs afgerond. Bij het aanleggen kwam men echter bosjes tegen, waar mogelijk sporen van de miltvuurbacterie (*Bacillus anthracis*) in aanwezig zijn. Men laat deze bosjes met rust en legt de weg iets verder op neer. Je moet de bodem met deze sporen vooral niet aanraken. Maar waarom waarschuwt men voor deze dodelijke omgeving? Wat maakt deze bacterie dan zo dodelijk?

Mijn leerdoelen zijn:

1. Na dit onderzoek weet ik veel meer van de dodelijke werking van deze bacterie. Wie weet kan ik het nog een keer in de les gebruiken.
2. Ik verwacht dat ik leer op een juiste en efficiënte manier om informatie te vinden voor een literatuuronderzoek.
3. Door de tijdsdruk wordt ik gedwongen om deze literatuur op juiste manier te interpreteren en te verwerken in een verslag (ook met APA-normen).

Literatuur

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D., (2012). Brock. Biology of Microorganisms, Pearson, San Fransisco

Trescos, Y. Tournier, J. (2012). Cytoskelet as an Emerging Target of Anthrax toxins

Goel, A.K. (2015). Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance, World Journal of Clinical Cases.

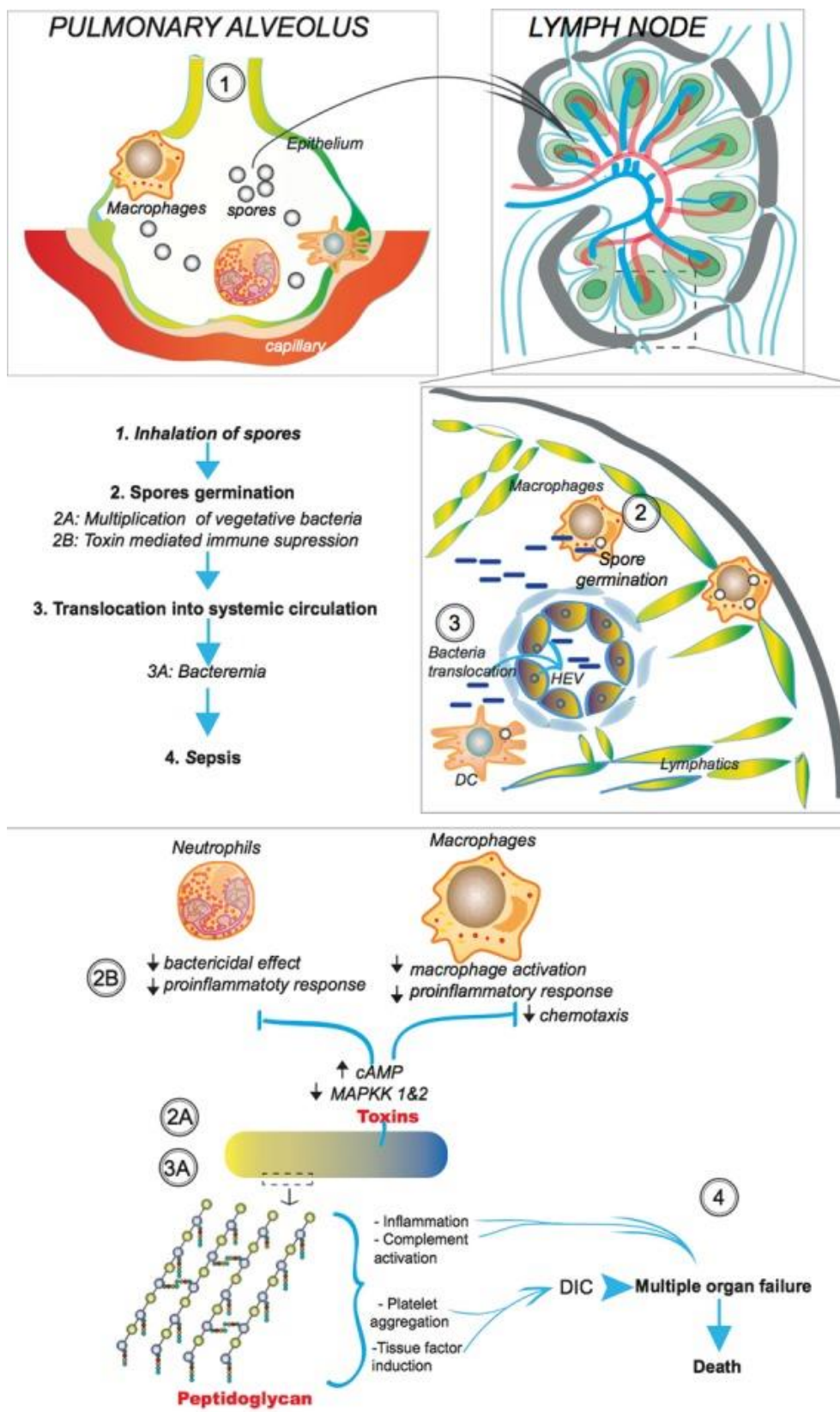
Pavan, M.E. et al (2011), *Bacillus anthracis*: een moleculair oog op een beroemde ziekteverwekker(vertaling). Argentinië Journal of Microbiology.

Goot, Van der, G., Young, J.A.T. (2009), Receptors of anthrax and cell entry, National Institutes of Health.

Xie, T. Auth, R.D., Frucht, D.M. (2011), The Effects of Anthrax Lethel Toxin on Host Barrier Function

Goot, Van der, G. Young, J.A.T. (2009), Receptors of anthrax toxin and cell entry, National Institutes of Health

Bijlage 3 Het Sepsismodel



Figuur 16. Het Sepsismodel

(Coggeshall et al., 2013)

Toelichting op dit sepsismodel

Belangrijk is dat de besmetting via de huid en via het maag-darmkanaal snel bij patiënten lichamelijke reacties laat zien. Hierdoor zoekt de patiënt sneller medische hulp en verkrijgt daarbij antibiotica. De bacterie is ondertussen bezig het immuunsysteem te verstoren, maar met behulp van antibiotica kan de werking van de bacterie teniet worden gedaan. Bij de inhalatiebesmetting zijn de lichamelijke reacties milder, waardoor de patiënt niet op tijd medische hulp zoekt. Antibioticum wordt dikwijls in een te laat stadium toegediend, waardoor de bacterie het immuunsysteem volledig kan verstoren en de strijd wint.

Stap 1: De sporen van *Bacillus anthracis* worden ingeademd en komen terecht in luchtwegen. Daarna komen ze terecht in de mediastinale lymfeknoop. De manier waarop dit laatste proces kan plaatsvinden, is nog niet bekend. Zie rechts bovenaan in figuur 16.

Stap 2: De verdere ontwikkeling van de spore vindt plaats in de tussenlaag van beide longen of net voordat de organen worden bereikt. De bacterie gaat nu zich verder vermenigvuldigen en produceert daarbij toxinen, die het immuunsysteem onderdrukken. Hierdoor kan de bacterie niet meer of niet voldoende worden geëlimineerd door het immuunsysteem. De toxinen beïnvloeden ook cAMP en MAPKK, waardoor de werking van het bloedvatstelsel, het zenuwstelsel, het immuunstelsel en het hormoonstelsel verstoord raakt.

Stap 3: De bacteriën komen in het bloedcirculatie. Ondertussen blijft de bacterie zich vermenigvuldigen. Bacteriëmie en uiteindelijk bloedvergiftiging (sepsis) ontstaan.

Stap 4: De hypothese is, dat de peptidoglycanlaag van de vegetatieve bacterie en de bescherming van de bacterie gedurende de replicatie, de oorzaak zijn van inflammatoire, het beïnvloeden van het immuunsysteem en de klontering van de bloedplaatjes. Dit tezamen veroorzaakt klontering in de kleine bloedvaten van de organen (DIC), orgaan falen en een eventuele dood van de patiënt.