



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Innate and adaptive host responses and their genetic control in tuberculosis : studies in Indonesia, a highly TB endemic setting**

Sahiratmadja, E.K.

### **Citation**

Sahiratmadja, E. K. (2007, November 27). *Innate and adaptive host responses and their genetic control in tuberculosis : studies in Indonesia, a highly TB endemic setting*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12469>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12469>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Samenvatting

Tuberculose (TB) is een infectieziekte die veroorzaakt wordt door *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). De ziekte wordt overgedragen door inademing van kleine luchtdruppeltjes die MTB bevatten en in de longen worden opgenomen. Niet iedere infectie met MTB resulteert uiteindelijk in de ziekte tuberculose: slechts 5 tot 10% van de mensen die met MTB geïnfecteerd raken ontwikkelen daadwerkelijk klinische tekenen van tuberculose; de rest ontwikkelt asymptomatische of latente MTB infectie. Een derde van de wereld bevolking is geïnfecteerd met MTB, met als gevolg jaarlijks 8 miljoen nieuwe TB ziektegevallen en 2 miljoen doden, zodat TB de tweede doodsoorzaak door infectieziekten is na AIDS. Dit uitzonderlijk hoge sterftegetal weerspiegelt het vermogen van MTB om een effectieve immuunrespons van de gastheer te omzeilen. De afweerreactie wordt gedeeltelijk ontweken en de mycobacterie weet langdurig te overleven. MTB wordt dus niet uit het lichaam verwijderd, maar wel in toom gehouden door het intacte immuunsysteem. TB is goed behandelbaar met antibiotica, maar de uitgebreidheid en lange duur van de medicamenteuze behandeling bemoeilijken de therapietrouw. Therapie uitval kan leiden tot resistentie, en is een van de belangrijkste oorzaken van de toename van multiresistente stammen, bekend als MDR (multidrug resistant) stammen. Het BCG vaccin dat uitgevonden werd in de jaren twintig van de vorige eeuw door Albert Calmette and Camille Guérin is tot nu toe het enige vaccin, hoewel het in grote delen van de wereld niet effectief blijkt te zijn tegen de belangrijkste vorm van TB, nl. open long TB bij de volwassene. Daarnaast is er het wereldwijde probleem van de co-infectie met HIV, waardoor het risico van reactivatie van latente naar actieve TB sterk verhoogd is. De alarmerend hoge TB incidentie, toenemende MTB resistentie en HIV-co-morbiditeit maken het verwerven van een dieper inzicht in de afweerreactie tegen MTB, de manier waarop MTB de afweer manipuleert, en de genetische of omgevingsfactoren die de vatbaarheid van de mens voor TB ziekte verhogen, noodzakelijk.

De afweerreactie is afhankelijk van de immunestatus van de gastheer, inclusief de aan- of afwezigheid van co-infecties, het stadium van infectie en mogelijk ook van de virulentie van de MTB stam. Een beter begrip van de afweerreactie en de invloed van MTB daarin kan betere aangrijpingspunten opleveren voor nieuwe strategieën voor de controle van TB. Daartoe hebben

wij een grootschalig onderzoek verricht in Indonesië, een land dat na China en India de meeste TB patiënten per jaar heeft: 285 per 100.000 inwoners per jaar. Het patiëntencohort dat in dit proefschrift wordt beschreven is afkomstig uit een relatief arm deel in Centraal Jakarta, waar deze nieuwe long-TB patiënten werden gediagnosticeerd in een gezondheidscentrum (Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia, PPTI). Gezonde controles uit hetzelfde gebied werden als referentie groep geworven.

### **Variaties van de gastheerrespons: de aangeboren en adaptieve immuniteit**

In de pathogenese van TB en bescherming tegen MTB speelt het immuunsysteem dus een centrale rol. Na MTB infectie treedt een georganiseerde respons op van het aangeboren immuunsysteem (*innate immunity*), later gevolgd door de respons van het adaptieve of specifieke immuun systeem waarbij T-helper-1 (Th1) cellen, macrofagen en cytokinen (voornamelijk IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ ) een hoofdrol spelen. MTB lijkt in staat om te interfereren met diverse belangrijke stappen in de aangeboren zowel als adaptieve afweer. Succesvolle inperking van MTB infectie is alleen mogelijk via meerdere immunologische mechanismen, die moeten helpen MTB-geïnfecteerde cellen te doden.

In onze studiepopulatie was na stimulatie van bloedcellen met MTB zowel de productie van IFN- $\gamma$  als de respons op IFN- $\gamma$  significant verminderd tijdens actieve TB, terwijl normalisatie optrad tijdens TB genezing. Die onderdrukking van zowel IFN- $\gamma$  productie als de IFN- $\gamma$  receptor signalering kan bijdragen aan de ernst van de ziekte en ziekteactiviteit (**hoofdstuk 2**). Wij hypothetiseren dat de onderdrukking van zowel IFN- $\gamma$  productie als IFN- $\gamma$  receptor activiteit synergistisch bijdraagt aan verminderde afweer tegen MTB, op het niveau van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem.

Verminderde IFN- $\gamma$  productie bestond uit een MTB-specifieke component, die omkeerbaar bleek, en een niet-specifieke, onomkeerbare component: mitogeen (PHA) geïnduceerde IFN- $\gamma$  productie bleek blijvend verlaagd in patiënten met TB, onafhankelijk van het stadium van hun ziekte en onafhankelijk van behandelstatus. De totale duur van de onderdrukking van de IFN- $\gamma$  productie in TB patiënten voor tijdens en na behandeling zal in vervolgonderzoek moeten worden opgehelderd.

IFN- $\gamma$  wordt geproduceerd in reactie op de signaal stoffen interleukine-12 (IL-12) en interleukine-23 (IL-23). Hoewel we vaststelden dat IFN- $\gamma$  productie

laag was, was er tijdens actieve TB echter geen onderdrukking van de productie van de belangrijke IL-12/23 p40 subunit. Dit suggereert dat er tijdens actieve TB onderdrukking is van IFN- $\gamma$  productie die onafhankelijk is van regulering door IL-12/23p40. IL-12 en IL-23 hebben waarschijnlijk verschillende rollen in de gastheerrespons op infectie.

In tegenstelling tot de verlaagde IFN- $\gamma$  productie was er een licht toegenomen productie van TNF- $\alpha$  gedurende actieve infectie. Deze productie daalde licht na behandeling. Tenslotte lieten we zien dat de IFN- $\gamma$ /IL-10-ratio sterk toeneemt tijdens genezing van TB. De IFN- $\gamma$ /IL-10-ratio kan dienen als een nieuwe biomarker voor de effectieve, en wellicht curatieve gastheerrespons op MTB.

Helper CD4-positieve T-cellen en cytotoxische CD8-positieve T-cellen scheiden niet alleen IFN- $\gamma$  maar ook granulysin uit, samen met perforine en granzyme-B. Deze molekulen liggen opgeslagen in cytotoxische granules in de T-cel. Granulysin heeft een breed antimicrobieel spectrum, en kan zowel bacteriën, schimmels, parasieten als tumorcellen doden. Het is in staat om extracellulaire MTB te doden, en in aanwezigheid van perforine kan het ook intracellulaire MTB doden.

In ons cohort waren plasmaconcentraties van granulysin laag tijdens actieve TB, stijgend naar normaal tijdens de genezingsfase en sterk verhoogd na beëindiging van de behandeling. Deze toename, die waarschijnlijk het effect is van cytotoxische T/NK cellen, kan dus ook als een nieuwe biomarker van de cellulaire immuunactiviteit tegen TB worden gezien (**hoofdstuk 3**). Ook hier zal door vervolgonderzoek nog moeten worden opgehelderd wanneer de granulysin concentraties weer normaliseren tot het niveau van controles. In tegenstelling tot granulysin werden in het plasma van patiënten met actieve TB juist hogere spiegels van circulerend IFN- $\gamma$  gevonden dan bij patiënten na therapie of bij controles. Dit circulerende IFN- $\gamma$  komt waarschijnlijk vrij bij de lokale productie uit geactiveerde lymfocyten die zich bevinden ter plaatse van de MTB infectie, of wordt geproduceerd door NK-cellen.

Al met al tonen hoofdstuk 2 en 3 aan dat type-1 cytokinen, IFN- $\gamma$  / IL-10 ratio's en granulysin concentraties nieuwe biomarkers kunnen vormen voor zowel actieve TB als voor het genezingsproces. Eveneens tonen we aan dat er een algemene onderdrukking is van IFN- $\gamma$  receptor signalering tijdens actieve TB.

### Variaties in genetische factoren van de gastheer

TB ziekte is de uitkomst van een complexe samenspel tussen micro-organisme, gastheer en de omgeving. Het ontrafelen van dit samenspel door bestudering van de gastheerrespons en de genetische factoren die een rol spelen in de vatbaarheid voor en de manifestering van de ziekte, is een grote uitdaging. Talrijke studies hebben aanwijzingen gevonden voor een rol van genetische factoren bij het controleren van MTB, maar er werden tegenstrijdige resultaten gevonden in verschillende populaties; specifieke allelen of allel-combinaties waren bv. niet consistent geassocieerd met bescherming tegen of vatbaarheid voor de ziekte.

Wij hebben verscheidene genetische markers bestudeerd waarvan beschreven was dat ze mogelijk invloed hadden op de vatbaarheid voor TB, waaronder genen die coderen voor type-1-cytokinen (o.a. *IL12B* en *IFNG*) en type-1-cytokine-receptoren (o.a. *IL12RB1* en *IFNGR1*). Van schadelijke mutaties in de genen die coderen voor eiwitten in de IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ -as is bekend dat ze leiden tot een extreme vatbaarheid voor infectie met omgevingsmycobacteriën. Meer subtiele variaties in deze genen zouden dus de vatbaarheid voor meer virulente mycobacteriën, zoals MTB, kunnen beïnvloeden. In onze studiepopulatie hebben we bekende, enkelvoudige nucleotide polymorfismen (SNPs) gevonden in het *IL12RB1* gen, evenals twee nieuwe varianten (**hoofdstuk 4**). De distributie van de allelen en genotypen in het *IL12RB1* gen tussen TB patiënten en gezonde controles heeft geen significante verschillen vertoond.

Interessant was dat een genetische variatie in de *IL12B* promotor geassocieerd is met bescherming tegen TB in BCG-gevaccineerden. Deze bevinding ondersteunt indirect zowel de rol die IL-23 speelt in het genereren van geheugen-T-cellen, als de rol die IL-12 speelt in de afweer tegen TB, aangezien mensen die heterozygoot zijn voor deze variaties in respons op LPS inderdaad hogere IL-12p40 spiegels produceren, een essentiële component van zowel IL-12 als van IL-23. Deze observatie strookt met het feit dat een adequate geheugenrespons op BCG-vaccinatie IL-12p40-afhankelijk is.

Gastheercellen bespeuren de aanwezigheid van MTB door gebruik te maken van meerdere herkenningssystemen, via een reeks van samenwerkende receptoren. Vooral PRRs (pattern recognition receptors) zijn belangrijk voor de herkenning van MTB en de daaraan gekoppelde activering van het immuunsysteem. PRRs vormen een centrale component in het bepalen van de uitkomst van vele infecties. In onze grootschalige genetische studies konden

we van Toll-achtige receptoren (o.a. TLR8), DC-SIGN, complement en scavenger receptoren aantonen dat ze geassocieerd zijn met vatbaarheid voor TB infectie (**hoofdstuk 5**).

*Natural resistance associated macrophage protein* (NRAMP1), een eiwit dat mineralen transporteert, speelt mogelijk een rol in het transport van ijzer in macrofagen en verhoogt de vatbaarheid voor infecties in andere populaties, zoals onder andere in een studie in Gambia is beschreven. Variaties in *NRAMP1* waren in onze studie echter niet geassocieerd met vatbaarheid voor TB (**hoofdstuk 6**). *NRAMP1* variaties verschillen fors tussen verschillende populaties. Bovendien is de verdeling van *NRAMP1* allelen verschillend ten opzichte van andere studies in Azië. Verspreiding van allelen zou kunnen verschillen per continent of ook tussen verschillende volkeren op hetzelfde continent. Dit zou het gevolg kunnen zijn van selectiedruk in het verleden.

Grootschalige associatiestudies van verschillende populaties zijn essentieel om het exacte verband te verhelderen tussen genetische variaties en de vatbaarheid voor TB infectie.

### **Variaties in ziektebeeld**

Veel van de aanzienlijke verschillen in blootstelling aan en uitkomst van infectie met MTB kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan een complex samenspel tussen gastheer, ziekteverwekker en omgevingsfactoren. TB kan zich in de kliniek presenteren in verschillende gradaties van ernst en vormen, bijvoorbeeld long (pulmonale)- en extrapulmonale TB. In onze studie hebben we alleen long-TB patiënten bestudeerd.

Gebaseerd op röntgenonderzoek van de thorax kan de ernst van long-TB worden gegradueerd als mild, matig ernstig of ernstig. Deze indeling is echter afhankelijk van zowel de kwaliteit van de beeldvorming als de interpretatie door de radioloog en is daardoor subjectief.

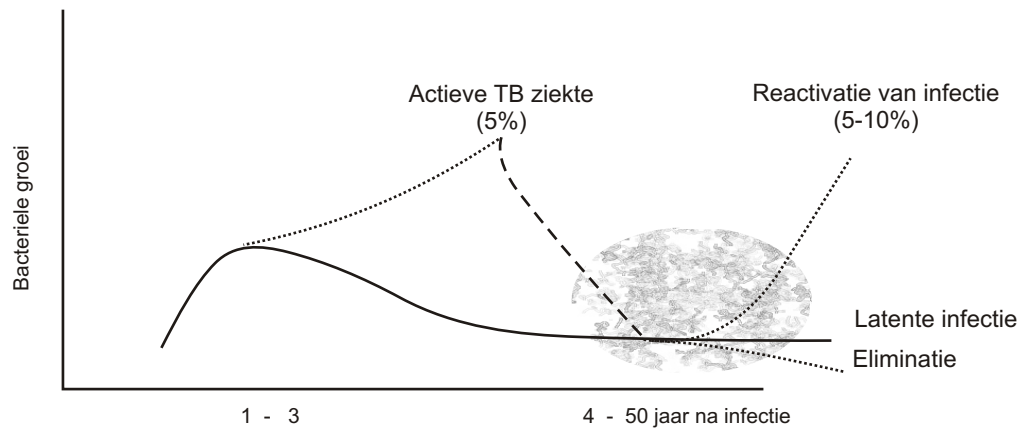
Ziekte-ernst kan ook worden bepaald door analyse van objectievere, klinische en hematologische gegevens. TB is bijvoorbeeld geassocieerd met relatieve ondervoeding, gedefinieerd door een verlaagde “body mass index”. TB is ook geassocieerd met anemie, die wordt gevonden in meer dan 60% van de gevallen. Ook een snelle, eenvoudige en goedkope bepaling van de bezinking van rode bloedcellen (BSE) die veel gebruikt wordt in Indonesische klinieken, en C-reactive protein (CRP) blijken gevoelige voorspellers van ontsteking en blijken eveneens geassocieerd met ernst van ziekte (**hoofdstuk 2**).

Anemie, als een van de ziekte presentaties in TB, is interessant om te bestuderen, omdat men zich moet realiseren dat in TB endemische gebieden waar ook andere infecties veel voorkomen, anemie niet alleen veroorzaakt kan worden door ondervoeding of ijzergebrek, maar ook door infecties. Aanvullende (en goedkope) parameters als BSE zouden voldoende moeten zijn om infectie uit te sluiten voordat ijzeraanvulling voorgeschreven worden. De anemie die beschreven is in **hoofdstuk 6** bleek duidelijk anemie door chronische ziekte, in dit geval TB, en niet door ijzergebrek. Ijzeraanvulling voor TB-patiënten is niet noodzakelijk omdat ijzerparameters verbeterden tot het niveau van gezonde controles en hemoglobine waarden normaliseerden na succesvolle behandeling met tuberculostatica zonder dat ijzeraanvulling gegeven werd. Daarom dient ijzersuppletie, tegenwoordig vaak voorgeschreven in de eerstelijns gezondheidszorg in Indonesië, beperkt te worden tot die groepen bij wie ijzergebrek het meest voorkomt, zoals kinderen en vrouwen van de vruchtbare leeftijd.

De wereldwijde toename van suikerziekte (DM II) is ook voelbaar in ontwikkelingslanden, waar TB endemisch is. DM II is één van de risicofactoren geworden voor TB. In onze studie presenteerden patiënten met TB en DM II zich met een lagere Karnofsky-index en meer symptomen, vooral met meer gewichtsverlies (**hoofdstuk 7**). Er was echter geen bewijs voor ernstiger ziekte volgens bloedtesten, bacteriologische en radiologische onderzoeken. Interessant is wel dat DM II een negatief effect heeft op de uitkomst van TB behandeling aangezien 22% van alle sputumkweken nog positief bleek *na* TB behandeling. Dit onderstreept de noodzaak tot verbetering van de zorg voor diegenen die naast TB ook DM II hebben. Daar DM II bij 14,8% van onze TB-patiënten aanwezig is, is het belangrijk dat bij TB-patiënten nuchtere bloedsuikers worden bepaald om aanwezigheid van (latente of manifeste) DM te onderzoeken.

### **Toekomstperspectieven**

De initiële fase van MTB-infectie wordt gekarakteriseerd door snelle bacteriële groei. Ongeveer 5% van de geïnfecteerde personen ontwikkelt primaire TB in de eerste jaren na infectie (Figuur 1). In de overgrote meerderheid kunnen de gevormde granulomen MTB onder controle houden, waarschijnlijk in een slaaptoestand, waarin MTB zuurstof en voedingsstoffen worden onthouden. Dit resulteert in latente infectie met een minimale bacteriële



### **Figuur 1. De ontwikkeling van MTB infectie.**

In de meeste mensen die geïnfecteerd raken door MTB, ontwikkelt zich een latente TB fase. Deze mensen vormen een potentieel reservoir voor transmissie van MTB. Slechts in 5 tot 10% van deze mensen ontwikkelen zich later klinische tekenen van tuberculose.

vermenigvuldiging. Daar 5 tot 10% van alle latent geïnfecteerde individuen een reactivatie van TB zal krijgen, zijn zij een reservoir voor MTB en daarmee potentiële besmetters in een later stadium van het leven. Daar latente TB een chronische infectie is, is het immuunsysteem gedurende een periode van vele jaren chronisch blootgesteld. Hoe deze chronische infectie de immunorespons beïnvloedt, en wat voor impact deze heeft op de vorming of uitputting van immunologische geheugen cellen is een belangrijke vraag die nog onbeantwoord is.

Kennis van de gastheerrespons in individuen met een latente infectie die geen ziekte ontwikkelen en dus natuurlijk resistent zijn zal kunnen helpen om de beschermende antigenen en afweermechanismen te identificeren. Deze zullen de diagnose van latente TB kunnen vergemakkelijken en behulpzaam kunnen zijn bij de ontwikkeling van nieuwe TB vaccins, zoals post-exposure-vaccins, die ten doel hebben reactivatie van TB in de reeds geïnfecteerde gastheer te voorkomen.

De resultaten van onze studies leiden tot diverse nieuwe vragen die beantwoord moeten worden in vervolgstudies waarin de dynamiek van de



gastheerrespons tegen TB wordt onderzocht. Bijvoorbeeld, de verlaagde PHA-geïnduceerde IFN- $\gamma$  respons normaliseerde niet tijdens behandeling, en granulysin-serum spiegels bleven na behandeling voor TB onverwacht hoog. Met additionele langere vervolgstudies kan beoordeeld worden of IFN- $\gamma$  productie permanent verlaagd blijft bij individuen die vatbaar zijn voor TB en of de lage granulysin-spiegels tijdens actieve TB het resultaat zijn van de infectie of al aan de infectie voorafgingen.

Ook is het interessant te bepalen of mensen met lage granulysin- en IFN- $\gamma$  spiegels een hoger risico hebben op TB in grotere studies. Analyse van contacten in het huishouden van actieve TB patiënten zal verder kunnen bijdragen bij aan inzichten in het ontstaan van latente TB en beschermende immuiteit. Deze nieuwe onderzoeksvragen willen wij beantwoorden in nieuw te plannen vervolgonderzoeken.

Immunologisch onderzoek van nauwkeurig omschreven patiëntenpopulaties met een natuurlijk beloop van TB of de weerstand daartegen zal helpen deze inzichten te verwerven. De bestaande samenwerking tussen Indonesië en Nederland heeft al veel nieuwe inzichten opgeleverd in de klinische epidemiologie, immunologie, immunogenetica, microbiologie en farmacologie van TB en TB-behandeling. Continuering van deze vruchtbare samenwerking moet de kwaliteit van dit onderzoek vergroten en kan bijdragen aan de zo noodzakelijke ontwikkeling van betere vaccins, diagnostische tools en antibiotica van TB.

