



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Tracking helminths : from molecular diagnostics to mechanisms behind immune polarization

Kaisar, M.M.

Citation

Kaisar, M. M. (2017, September 19). *Tracking helminths : from molecular diagnostics to mechanisms behind immune polarization*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/57928>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/57928>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57928> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kaisar, M.M.

Title: Tracking helminths : from molecular diagnostics to mechanisms behind immune polarization

Issue Date: 2017-09-19

SAMENVATTING

Wereldwijd zijn 1.5 miljard mensen geïnfecteerd met parasitaire wormen (helminthen) waarvan via de bodem overdraagbare helminthen (STH) en schistosomen de meest voorkomende zijn. Een aanzienlijk deel van de aangedane populatie lijdt onder een hoge ziektelast ten gevolge van deze infecties. Maar naast de vaak belichte nadelige gevolgen van wormeninfecties zijn er ook gunstige effecten op het afweersysteem van de gastheer. Parasitaire wormen zijn namelijk meesters in het reguleren van het immuunsysteem van de gastheer met als doel zichzelf te beschermen, maar ook om te voorkomen dat de gastheer zichzelf beschadigt door een overdreven en onnodige afweer. Als gevolg van deze regulatie blijken wormeninfecties bescherming te bieden tegen ontstekingsziektes zoals coeliakie, inflammatoire darmziekten, diabetes en astma. Het doel van dit proefschrift is om de onderliggende mechanismen van zowel de Yin (positieve) en Yang (negatieve) gevolgen van worm infecties beter te begrijpen. In Hoofdstuk 2 en 3 zijn toegespitst op nieuwe moleculaire technieken om wormeninfecties beter vast te kunnen stellen, waarna in Hoofdstuk 4, 5, 6 en 7 de interactie tussen de parasiet en de gastheer op het niveau van het afweersysteem zal worden bestuurd.

Hoofdstuk 2

Microscopische methoden zijn altijd de eerstelijns aanpak geweest bij het diagnosticeren van infecties met helminths. Echter, omdat deze technieken moeilijk zijn te standaardiseren, is er behoefte aan de ontwikkeling van betere detectiemethoden, waarvan moleculaire diagnostiek, wat staat voor de detectie van parasiet-specifiek DNA, er één kan zijn. In dit hoofdstuk wordt de effectiviteit van de multiplex real-time PCR voor de detectie van DNA van STHs (mijnwormen, *Ascaris lumbricoides* en *Strongyloides stercoralis*) vergeleken met de microscopie methode in feces monsters verzameld in twee geheel verschillende endemische gebieden. In de Indonesië populatie testte 35,4% van de bestudeerde personen positief voor helmintheninfecties wanneer één specifieke microscopie methode, de 'formal ether concentratie'-methode (FEC) werd toegepast. In dezelfde populatie testte 81,4% positief met real-time PCR. In Mozambique gaf een combinatie van microscopie methoden (direct uitstrijkje, Kato uitstrijkje, FEC, Baermann methode en copro-kweek) een positieve uitslag van 77,9% terwijl de multiplex real-time PCR 73,6% positief beschouwde. Deze studie suggereert dat DNA detectie in monsters uit feces met behulp van multiplex real-time PCR een meer betrouwbare en beter gestandaardiseerde uitslag geeft dan alleen microscopische analyse van deze monsters.

Hoofdstuk 3

Trichuris trichiura is wereldwijd een van de meest voorkomende bodemoverdraagbare helminthen. Echter, vanwege de moeilijkheid om DNA te extraheren van *T. trichiura* eieren, is het altijd lastig geweest om DNA op eenvoudige wijze te detecteren in fecesmonsters. In deze studie hebben we de opwerkprocedure voor fecesmonsters verder geoptimaliseerd met als doel *T. trichiura* DNA beter te kunnen aantonen in een patiënt cohort uit een endemische regio in Indonesië. Wij concluderen dat de combinatie van ethanol preservatie en een 'bead-beating' procedure (een proces van mechanisch beschadiging) voorafgaand aan DNA extractie uit het fecesmonster resulteerde in een hogere sensitiviteit voor detectie van *T. trichiura* infectie: 55% met de geoptimaliseerde methode versus 40% in de controle procedure (zonder ethanol of 'bead-beating'). Daarbij detecteerde de geoptimaliseerde methode een significant grotere hoeveelheid *T.*

trichiura DNA. Deze bevindingen laten zien dat de geoptimaliseerde methode meer geschikt is voor het detecteren van een *T. trichiura* infectie. Belangrijker, ten opzichte van de voorheen gebruikte methode had de geoptimaliseerde methode slechts een beperkt effect op de PCR resultaten van andere bodem overdraagbare helminthen.

Hoofdstuk 4

In Hoofdstuk 4ier onderzoeken wij het lipiden-profiel van zowel de verschillende levensstadia (cercariae, wormen en eieren) van *Schistosoma mansoni* als de corresponderende extracten om helminth-afgeleide lipiden met potentieel immuunmodulerende werking te vinden. Zoals verwacht vertoonden de verschillende levensstadia een duidelijk verschillende lipide signatuur. Interessant genoeg was de lipide samenstelling van de verschillende levensstadia van de parasiet en hun corresponderende extracten nagenoeg gelijk. Deze overeenkomsten tussen de extracten en de hele organismen valideren het gebruik van de veel gebruikte parasiet preparaties zoals oplosbare ei antigenen (eng: soluble egg antigens, SEA) in modellen om de immunologie van parasiet-gastheer interacties te bestuderen. Een belangrijke bevinding was de aanwezigheid van prostaglandinen (PG) specifiek in ei en cercariepreparaten. Prostaglandinen zijn lipiden die bekend staan om hun modulerende effecten op immuuncellen. Onze studie naar de lipide profielen van helminthen laat daarmee zien dat deze aanpak mogelijk nog andere immuunmodulerende lipiden zou kunnen identificeren.

Hoofdstuk 5

Na de detectie en karakterisering van helminthen, gaan wij over op het gedetailleerd bestuderen van hun interactie met het menselijke immuunsysteem. Dendritische cellen (DCs) staan centraal in de polarisatie van immuunreacties en zijn vaak bestudeerd in de context van helminthen-infecties. The activering van DCs wordt gekarakteriseerd door verandering in expressie van een groot aantal eiwitten. Ons doel was om de expressie van eiwitten te correleren aan de Th2-inducerende capaciteit van helminth-geconditioneerde DCs. Met behulp van een op massa-spectrometrie gebaseerde methode onderzochten wij het proteoom van DCs gestimuleerd met *S. mansoni*-afgeleide producten, SEA en omega-1 (ω -1). Omega-1 is een glycoproteïne afgeleid van SEA en staat bekend als factor die een sterke Th2respons kan induceren. Wij observeerden een verhoging van de expressie van twee eiwitten die betrokken zijn bij ribosomale en mitochondriale functie. Dit wijst erop dat zowel SEA als ω -1 een effect kunnen hebben op eiwit-expressie en cellulair metabolisme van DCs. Inderdaad, SEA en ω -1 leidden tot een verlaging van de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij antigeenverwerking en presentatie. Deze bevindingen corresponderen grotendeels met de hypothese dat een zwakkere formatie van de immuun synaps tussen DCs en T cellen kan leiden tot Th2 differentiatie.

Hoofdstuk 6

Wij probeerden gebaseerd op de bevindingen uit Hoofdstuk 4 een mogelijke rol voor lipide mediators te bestuderen in de inductie van Th2 cellen door DCs die met SEA zijn gestimuleerd. Wij vonden dat de lipide mediator PGE₂ en zijn varianten niet alleen aanwezig zijn in SEA, maar ook geproduceerd werden door DCs nadat zij met SEA gestimuleerd waren. SEA bleek te binden aan de receptoren dectin-1 en dectin-2 op DCs, waarna er een signaleringsroute geactiveerd werd bestaande uit de Syk, ERK, cPLA₂, COX-1 en COX-2. Het gevolg hiervan was dat PGE₂ geproduceerd en uitgescheiden werd door de DCs. De PGE₂ die geproduceerd werd, werkte

Nederlandse Samenvatting

vervolgens terug op de DCs en stimuleerde de expressie van OX40L, een ligand waarvan al langer bekend is dat het DCs de capaciteit geeft om Th2 differentiatie te induceren. Deze as bestaande uit dectin-PGE2-OX40L, verklaart volledig waarom SEA waaruit omega-1 verwijderd is nog steeds DCs de capaciteit geeft om Th2 responsen te induceren. Naast de beschreven in vitro experimenten bleek deze as ook van groot belang voor de inductie van Th2 cellen in vivo en daarmee geassocieerde processen zoals de formatie van granulomen in de lever van met *S. mansoni*-geïnfecteerde muizen. Hiermee hebben wij in dit hoofdstuk een nieuwe manier gevonden waarop parasitaire wormen DCs conditioneren om Th2 differentiatie te induceren.

Hoofdstuk 7

Recente studies hebben aangetoond dat helminthen regulatoire T cellen (Tregs) kunnen induceren door de productie van korte-keten vetzuren (eng. Short chain fatty acids, SCFAs) door de samenstelling van microbiota in de darm te veranderen. SCFA butyraat in het bijzonder is een belangrijke drijfveer van Treg activatie. Hoe SCFAs deze regulatoire reactie in mensen teweegbrengen is echter onbekend. Daarom onderzochten wij in dit hoofdstuk óf, en via welke mechanismen, SCFAs menselijke DCs konden conditioneren om Tregs te activeren. Wij vonden dat butyraat humane DCs conditioneert om IL10-producerende type 1 regulatoire T cellen (Tr1) te induceren. Butyraat induceert RALDH activiteit, een enzym belangrijk voor de conversie van vitamine A naar tretinoïnezuur (eng. retinoic acid, RA). RA werkt vervolgens op DCs om RALDH expressie te verhogen en direct op T cellen om Tr1 differentiatie te bevorderen. Wij vonden dat butyraat RALDH activiteit in DCs verhoogde door middel van zowel remming van histon deacetylatie als signalering via GRP109A. Deze bevindingen geven nieuwe inzichten in de mechanismen waardoor helminthen tolerogene immuunreacties in mensen kunnen induceren; door het bevorderen van de productie van SCFA door microbiota in de darmen.

De studies beschreven in dit proefschrift helpen om de detectie van helminthen-infecties te verbeteren, wat essentieel is voor het bestuderen van deze parasitaire wormen en hun interactie met de menselijke gastheer. Bovendien is de ontwikkeling van sensitievere diagnostische methoden van groot belang om een beter overzicht te krijgen van de incidentie en prevalentie van helminth infecties, wat cruciaal is om te evalueren of programma's met als doel het elimineren van helminth infecties werken, die op dit moment bezig zijn in verschillende delen van de wereld. Daarnaast heeft dit proefschrift bijgedragen aan het tot stand komen van nieuwe inzichten in de manier waarop het samenspel van worm en het immuunsysteem van de gastheer resulteert in het initiëren van type 2 en regulerende immuunresponsen. Dit draagt bij aan de identificatie van nieuwe druggable targets waarmee die type immuunresponsen gemanipuleerd kunnen worden, en zodoende in de toekomst mogelijk gebruikt kunnen worden voor het ontwikkelen van therapeutische methoden om ontstekingsziektes te behandelen.