



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring host-immune-microbial interactions during intestinal schistosomiasis

Costain, A.H.

Citation

Costain, A. H. (2023, February 2). *Exploring host-immune-microbial interactions during intestinal schistosomiasis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3514630>

Version: 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/1887/3514630>

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

Nederlandse Samenvatting

Parasieten zijn ongelooflijk fascinerende organismen, die bekend zijn vanwege hun afschuwwekkende eigenschappen (bijv. hun bizarre uiterlijk en unieke gedragingen). Deze hebben vorm hebben gekregen door hun afhankelijkheid om te leven van/in een ander organisme (een gastheer) en zo te groeien, zich te voeden en verder te gedijen. Om hun overleving op de lange termijn te garanderen, hun levenscyclus te voltooien en infectie-gerelateerde pathologie te verminderen, hebben veel parasieten allerlei ingenieuze strategieën ontplooid om het immuunsysteem van de gastheer te moduleren, te onderdrukken en te omzeilen. Belangrijk is dat, hoewel parasieten voornamelijk als negatief worden neergezet, hun vermogen om immuun cellen te moduleren ook gunstig kan zijn voor de gezondheid van de gastheer. Toenemend bewijs suggereert dat blootstelling aan parasieten en symbiotische microorganismen (bijv. bacteriën en schimmels) tijdens de kindertijd cruciaal is voor een adequate uitrijping van het immuunsysteem en dat dit kan beschermen tegen immuungerelateerde ziekten, zoals auto-immuniteit en allergieën. In dit proefschrift worden mechanismen in kaart gebracht waarmee de parasitaire *Schistosoma* platworm de immuniteit van de gastheer kalibreert en beïnvloedt, met nadruk op hun impact op de darmomgeving en interacties met tolerogene B-cellen.

Schistosomiasis, ook bekend als Bilharzia, is een genegeerde maar belangrijke tropische ziekte, met meer dan 240 miljoen gevallen en naar schatting 200.000 sterfgevallen per jaar, en is als de tweede geplaatst, alleen voor Malaria, in termen van verzwakking en morbiditeit. Deze parasitaire ziekte is wijdverbreid in Afrika ten zuiden van de Sahara, regio's van Zuid-Amerika en Azië, en heeft grote gevolgen voor mensen uit gemeenschappen met een lage sociaaleconomische status en beperkt toegang tot veilig drinkwater. De drie meest voorkomende soorten *Schistosoma* wormen die mensen infecteren zijn *S. mansoni*, *S. japonicum* en *S. haematobium*. De twee eerstgenoemde soorten zijn verantwoordelijk voor darmziekten, terwijl *S. haematobium* gevolgen heeft voor de urinewegen. De focus van dit proefschrift ligt op *S. mansoni*.

De *Schistosoma* infectie begint bij contact met zoet water waarin vrijzwemmende parasitaire larven voorkomen, zogenaamde cercariae. Deze vorkstaartvormige parasieten dringen de huid binnen van hun toekomstige gastheer en migreren in de loop van enkele weken vanuit de huid, via de longen naar de bloedvaten van de lever en de darmen. Hier rijpen de onvolwassen *Schistosoma* wormen (schistosomula) uit tot volwassen mannelijke en vrouwelijke wormen, die vervolgens gaan paren en eieren produceren (tot 300 per dag per wormpaar) voor de rest van hun levensduur; dit kan jaren zijn zonder farmacologische interventies. In een ultiem geval van immuunontwijking en

bescherming van de gastheer, worden *Schistosoma*-eieren omsloten door immuuncellen van de gastheer en fibrotisch weefsel en vormen ze een immuunlaesie die bekend staat als een granuloom. De vorming van deze granuloma's is noodzakelijk voor de verplaatsing van eieren door de darmwand en de uitscheiding via de feces, zodat de eieren uiteindelijk buiten het lichaam terecht komen en hun levenscyclus kunnen voltooien in een geschikte zoetwaterslak. In praktijk slagen veel eieren er niet in om de darmwand te passeren en worden ze in plaats daarvan met de bloedstroom meegenomen naar de lever, waar ze vervolgens vastlopen in het lokale vaatbed en ook weer granuloma structuren vormen. Deze ontstekingshaarden nemen een centrale plek in de pathologie die geassocieerd is met *Bilharzia* en kunnen bij ernstige gevorderde ziekte tot de dood leiden.

Om de gezondheid van hun gastheer optimaal te houden en zo hun eigen overleving te veilig te stellen, gebruiken *Schistosoma* parasieten verschillende methodes om ontstekingsreacties te vervormen. Dit omvat als eerste het bevorderen van type 2-immuniteit om de granuloomvorming en het passeren van darmwand door de eieren te ondersteunen. Als tweede betreft het de ontwikkeling en activatie van tolerogene of onderdrukkende immuuncellen, die ontstekingsreacties gericht tegen de wormen maar ook de pathologie als gevolg van vastgelopen eieren (bv in de lever) zullen verminderen. De aanmaak van tolerogene immuuncellen, zoals regulerende B-cellen (Bregs) en T-cellen (Tregs), heeft ook een belangrijk 'bijwerking', nl dat dit de gastheer beschermd tegen immuunziektes, die worden gekenmerkt door een overactief immuunsysteem, zoals allergie, astma en auto-immuniteit.

Een experimenteel infectie model van schistosomiasis in muizen vormt een ideaal systeem om de mechanismen en moleculen te bestuderen die de parasieten gebruiken om de immuunreacties van de gastheer te moduleren. Allereerst het feit dat *Schistosoma* wormen zo meesterlijk zijn in het aansturen van Breg en Treg cellen kan op deze manier onderzocht worden en beter in kaart gebracht. Verder is het een heel interessant gegeven dat zowel schistosomiasis als allergie gekenmerkt door type 2-immuunreacties, maar beiden zich manifesteren met hele andere klinische symptomen. Het experimentele schistosomiasis model kan ook hier uitkomst bieden en meer inzicht verschaffen in de celtypes en de overdracht van signalen die betrokken zijn bij type-2 afweer en herstel van de gastheer. Deze verworven kennis kan gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen van allergie. Ten slotte kunnen we dit experimentele model gebruiken om impact van schistosomiasis op de integriteit van de darmwand en het omliggende weefsel te onderzoeken tijdens het uittreden van parasitaire eieren, zoals bijvoorbeeld de regulatie en herstel van slijmvliesontstekingen en interacties met lokale darmbacteriën.

Het eerste deel van dit proefschrift omvat een hoofdstuk met een gedetailleerd verslag van immuunreacties die optreden tijdens de loop van een *Schistosoma* infectie (Hoofdstuk 3) en biedt nieuwe inzichten in de effecten van *Schistosoma* eieren op de integriteit van de darmbarrière, de samenstelling van de microbiota en de mucosale immuniteit (Hoofdstuk 2&4).

De passage van parasitaire eieren vanuit de bloedvaten rondom de darmen, door de darmwand heen naar de feces van de gastheer is een raadselachtig en intrigerend proces. Om dit succesvol te laten verlopen, moeten de eieren meerdere barrières (zowel bloedvat- en slijmvlieswanden) passeren, moeten immuuncellen gerekruteerd en gemoduleerd worden voor de vorming van granuloma's, en moeten er herstelwerkzaamheden in gang gezet worden om weefselschade te genezen. In hoofdstuk 2 bespreken we onze huidige kennis van het migratieproces van *Schistosoma* eieren. We schetsen de interacties die optreden tussen de gastheer, de parasiet en de darmflora bacteriën om dit proces mogelijk te maken en speculeren we over de gevolgen van succesvolle (of niet-succesvolle) migratie van eieren op de gezondheid van de gastheer en de bescherming tegen immuunziektes.

Het verloop van een *Schistosoma* infectie kan in drie fasen onderverdeeld worden met bijbehorende kenmerkende immuunreacties. Gedurende de eerste paar weken worden zowel wat lichte type 1- als type 2-immuunreacties gevonden. Vervolgens vindt er een omslag plaats vanaf het punt dat de eiproductie op gang komt (week 5-6), wat tevens gepaard gaat met een sterk ontwikkelde type 2-immuunreactie. Tijdens de chronische fase van de infectie (vanaf week 12) zwakken de type 2-immuunreacties wat af en worden vooral sterk regulerende immuunreacties gevonden. Ook dit proces is gedetailleerd beschreven in Hoofdstuk 2, alsmede de laatste inzichten hierin gebaseerd op honderden onafhankelijke onderzoeksartikelen, allemaal gericht op verschillende tijdstippen van de infectie en bij verschillende aangedane organen.

In Hoofdstuk 3 beschrijven onderzoek naar de verschillende immuunreacties tijdens een experimentele infectie met schistosomiasis, waarbij we inzoomen op drie verschillende weefsels die tijdens de infectie worden aangetast: de lever, mesenteriale lymfeklieren (drainerende de darmen) en de milt. De immuuncellen in deze weefsel worden bestudeerd met behulp van histologische, cellulaire (flow cytometrie) en op gen-expressie (RNA-seq) gebaseerde technieken. Verder laten we zien door specifieke cellen tijdelijk uit het lichaam te verwijderen tijdens de beginfase van de eiproductie, dat bepaalde CD11c+ antigeen-presenterende cellen (inclusief dendritische cellen en macrofagen), een cruciale rol spelen bij het ontstaan van granuloomreacties en type 2-ontstekingen.

Ondanks de grote impact van schistosomiasis op de darm, heeft het grootste deel van de immunologische onderzoeken naar *S. mansoni* zich tot nu toe vooral gericht op de lever (waar ook ei-afzetting optreedt en dit leidt tot lokale fibrose vorming) of verder weg gelegen plekken, zoals de milt. Deze lacune komt gedeeltelijk voort uit technische beperkingen om immuuncellen levend te kunnen isoleren uit de darmen van schistosoom-geïnfecteerde muizen. De verwachting is dat dit wordt bemoeilijkt door de sterke anti-parasiet type 2-immunoreacties die hier ontwikkeld is, wat o.a. leidt tot een overmatige slijmproductie, weefselschade en herstelwerkzaamheden, pH-veranderingen en infiltratie van immuuncellen. Het is ons gelukt deze isolatie techniek werkend te krijgen. Daarom kunnen wij in Hoofdstuk 4 een gedetailleerde karakterisering van de darmomgeving geven tijdens experimentele schistosomiasis. We geven hier een specifieke nadruk op de samenstelling van de darmflora, integriteit van de darmbarrière en de vergelijking van immunoreacties in de mesenteriale lymfeklieren en de darm zelf. Door gebruik te maken van ei-producerende en niet-ei-producerende schistosome infecties – dit door infecties met vrouwelijke en mannelijke larven (wel eieren) of alleen mannelijke larven (geen eieren) toe te passen - laten we zien dat de passage van eieren de integriteit van de darm drastisch vermindert, de samenstelling van de darmflora wijzigt en de frequentie/profiel van immuuncellen in de darm en mesenteriale lymfeklieren aanpast. Verder bewijzen we met behulp van muizen zonder darmflora (bacterie-vrije muizen) en met fecustransplantaties dat de darmflora van schistosoom-geïnfecteerde dieren elementen van Type 2-immuniteit kan instrueren.

Het tweede deel van dit proefschrift richt zich op de instructie van regulerende cellen in de milt (Hoofdstuk 5&6) en het potentieel van darmflora bacteriën afkomstig uit schistosoom-geïnfecteerde dieren om allergische reacties in de luchtwegen te voorkomen (Hoofdstuk 6). Eerdere studies uit ons laboratorium toonde aan dat chronische infecties met *Schistosoma* allergische reacties in de luchtwegen kunnen voorkomen en dat zowel IL-10-producerende Breg cellen uit de milt en uit de longen hierbij betrokken zijn. De mechanismen die tot Breg cel vorming leiden tijdens een *Schistosoma* infectie zijn nog relatief ongedefinieerd. Eerdere studies en ongepubliceerde genexpressie-analyse uit ons laboratorium wijzen, onder anderen, in de richting van cytokines, zoals type I interferonen, voor de activering van Breg cellen tijdens chronische schistosomiasis. Alhoewel we vonden dat type I interferonen de expansie van Breg-cellen in laboratoriumkweken kunnen ondersteunen, de rol voor deze cytokines voor Breg cell ontwikkeling in het lichaam bleek zeer beperkt (Hoofdstuk 5).

In Hoofdstuk 6 gingen we verder met onze zoektocht naar het definiëren van immuunregulerende cellen, de vorming hiervan en de factoren die deze processen ondersteunen tijdens schistosomiasis, door wederom gebruik te maken van ei-producerende en niet-ei-producerende infecties. We vonden dat beide typen chronische infecties verschillende immuunregulerende cellen kunnen aansturen en bevorderen in de milt. Echter de T- en B-cellen van ei-producerende infecties bleken een superieur vermogen te hebben om het immuunregulerende cytokine IL-10 te produceren in vergelijking met T- en B-cellen van niet-ei-producerende infecties. Omdat het werk in Hoofdstuk 4 heeft aangetoond dat de darmflora samenstelling verschilt tussen ei-producerende en niet-ei-producerende infecties, vroegen we ons vervolgens af of de darmflora-bacteriën ook betrokken zijn bij de vorming van immuunregulerende cellen tijdens schistosomiasis en mogelijk het voorkomen van allergische luchtwegaandoeningen. Hiertoe hebben we fecustransplantaties vergeleken van ei-producerende en niet-ei-producerende geïnfecteerde muizen in bacterie-vrije allergische muizen. We vonden minder reclutering van typische 'allergische' immuuncellen in de luchtwegen van dieren die feces van ei-producerende infecties hadden ontvangen in vergelijking met dieren die feces kregen van niet-ei-producerende infecties. Tevens vonden we verschillen in type 1-reacties in zowel aangeboren en adaptieve immuuncellen.

Ten slotte bespreken we in Hoofdstuk 7 onze belangrijkste bevindingen en de implicaties ervan voor ons huidige begrip van gastheer-parasiet-microbiële relaties.