Universiteit
Leiden
The Netherlands

Schistosoma mansoni extracellular vesicles and their impact on the immune system: glycosylated messengers in host-pathogen communication

Kuipers, M.E.

Citation
Kuipers, M. E. (2024, September 25). *Schistosoma mansoni extracellular vesicles and their impact on the immune system: glycosylated messengers in host-pathogen communication*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4092867

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/1887/4092867

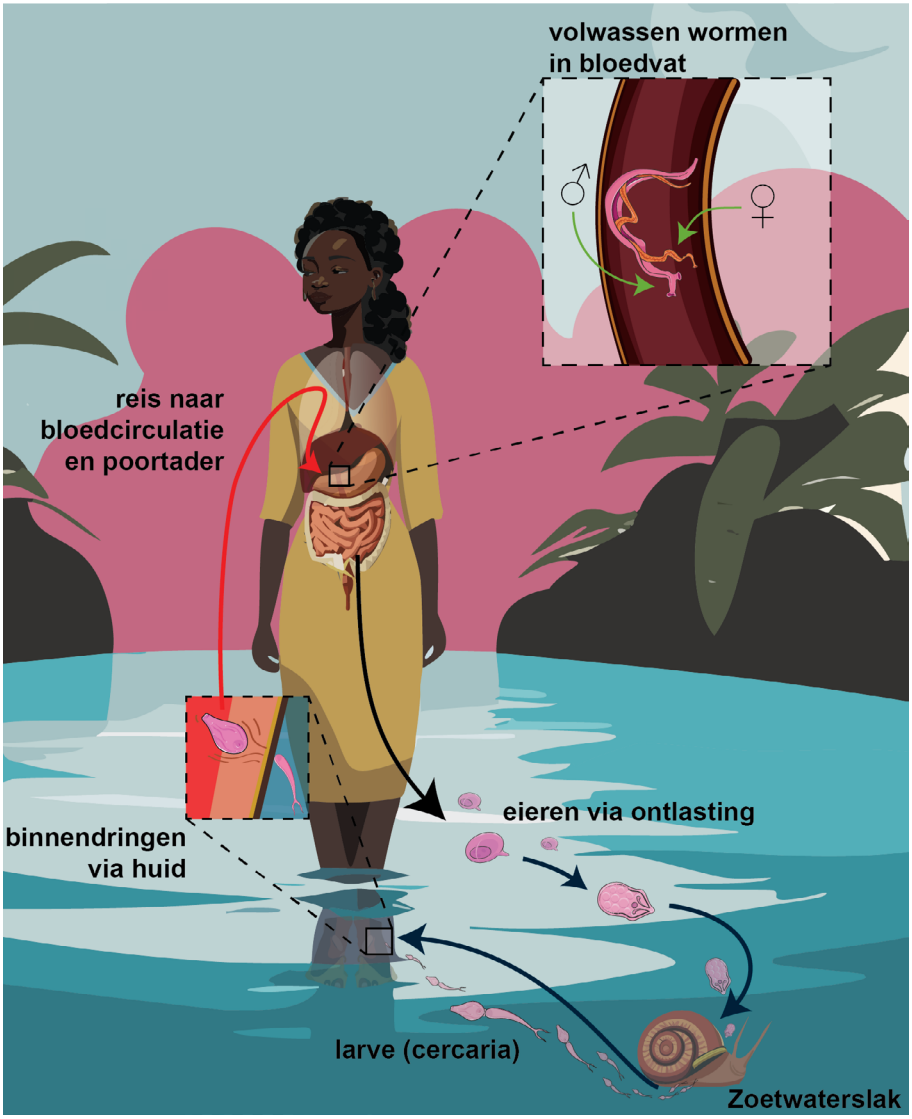
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

Samenvatting van dit proefschrift getiteld: 'Extracellulaire Vesikels van Schistosoma mansoni *en hun Impact op het Immuunsysteem: Geglycosyleerde Boodschappers in de Communicatie tussen Gastheer en Ziekteverwekker'*

Parasitaire wormen bestaan al langer dan de mensheid. Gedurende de ontwikkeling van de mens, en ook ons afweersysteem, zijn de wormen meegeëvolueerd. Ons afweersysteem is essentieel om ziekmakende binnendringers (zoals parasieten, bacteriën en schimmels) te ontdekken en onschadelijk te maken. Door de co-evolutie van worm en mens hebben parasieten optimale strategieën ontwikkeld om ons afweersysteem te kunnen sturen en/of af te remmen om zo te overleven in ons lichaam. Één van deze parasitaire wormen is *Schistosoma mansoni*. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie zijn er wereldwijd zo'n 250 miljoen mensen geïnfecteerd met Schistosoma-wormen. Aangezien de worm afhankelijk is van een slak als tussengastheer (zie Figuur 1), en deze slak alleen leeft in tropisch zoet water, wordt de overlast van infecties met deze parasiet enkel in tropische gebieden van de wereld ervaren. Waar goed sanitair ontbreekt, zullen de eieren via de ontlasting in het water terechtkomen waar het diertje uit het ei de slak in het water kan infecteren. De larven (genaamd cercariae) die zich in de geïnfecteerde slak ontwikkelen, komen in hetzelfde water terecht en kunnen daarna weer een mens infecteren door zich door de huid te wurmen. Eenmaal in de huid heet de larve dan een schistosomulum en deze gaat in de menselijke gastheer op zoek naar een bloedvat. De volwassen wormen (mannetjes en vrouwtjes), waar deze schistosomula zich tot ontwikkelen, leven voornamelijk in de poortader bij de lever en in de bloedvaten rondom de darmen en voeden zich met rode bloedcellen. Het vrouwtje van de wormparen produceert eieren die in de darmen moeten worden uitgescheiden (en via de ontlasting buiten het lichaam terecht komen) om de levenscyclus rond te maken. Echter, de eieren kunnen ook meegesleept worden in de bloedbaan en komen dan vast te zitten in het eerste vaatbed (met kleine bloedvaten) dat ze tegenkomen. Dit eerste vaatbed dat de eieren tegenkomen is de lever en hier kunnen ze een enorm sterke afweerreactie opwekken. Bij een langdurige, onbehandelde infectie met veel wormen kan dit leiden tot littekenvorming in de lever, leverfalen en uiteindelijk de dood van de gastheer.

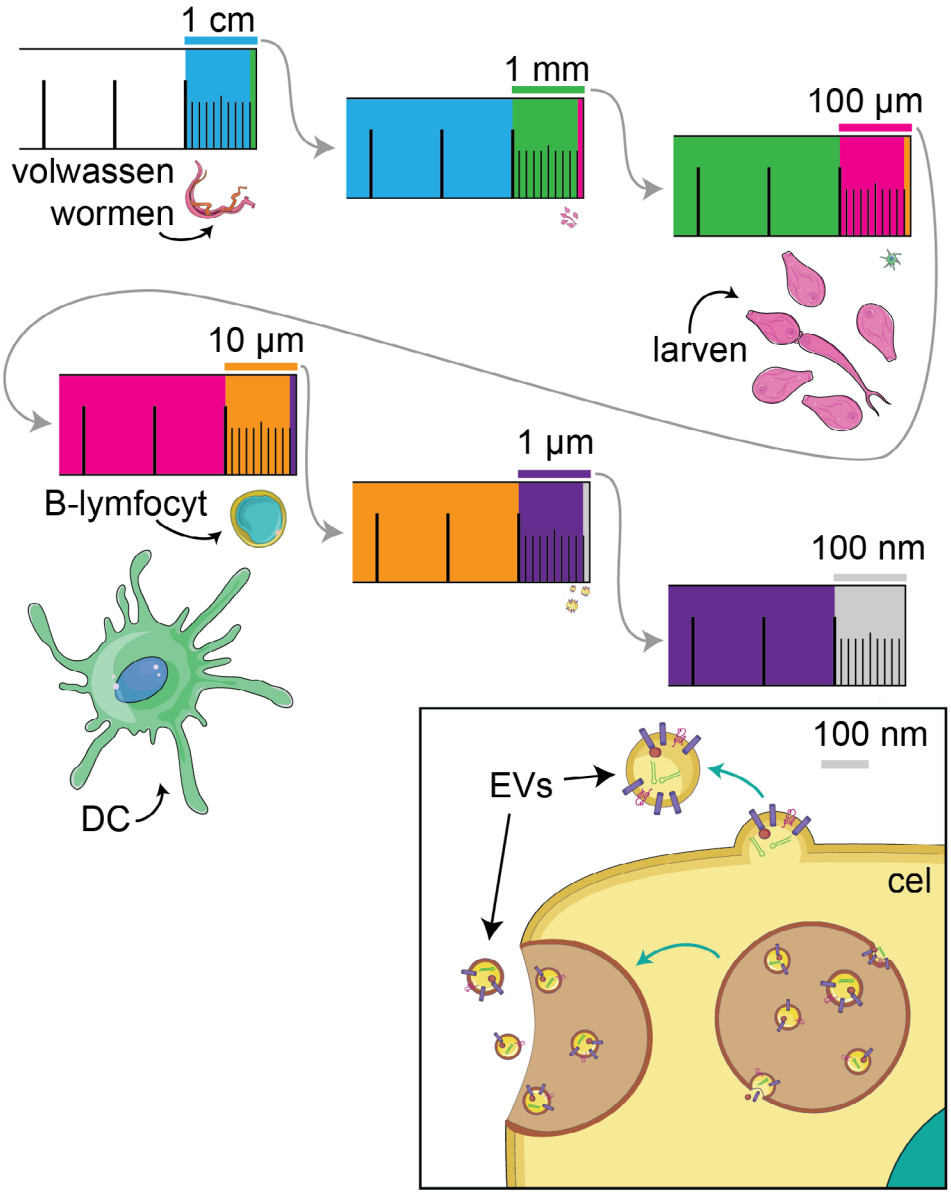
Toch is een infectie met deze parasiet niet alleen maar slecht. *Schistosoma*-parasieten zijn in staat om ons afweersysteem zodanig te sturen dat ze tientallen jaren in ons bloed kunnen leven. Door het sturen en dempen van het afweersysteem van de gastheer heeft dit als neveneffect dat ook andere afweerreacties bijgestuurd worden. Dit is met name te zien in het lage aantal mensen dat allergieën en



Figuur 1. Levenscyclus van *Schistosoma mansoni* parasiet.
De larven (cercariae) dringen de huid van de gastheer binnen en reizen via bloedvaten naar de poortader bij de lever waar ze ontwikkelen tot volwassen wormen. Een mannelijke en vrouwelijke worm vormen en paar waarbij de vrouwtjes de eieren leggen. Dit doen ze met name in de bloedvaten rond de darm omdat de eieren via de ontlasting het lichaam verlaten. Bij contact met water komt een miracidium uit het ei die een tropische zoetwaterslak kan infecteren. In deze slak ontwikkelt één miracidium zich tot vele nieuwe larven. De larven komen uit de slak weer vrij in het water en kunnen mensen infecteren die zich in het water bevinden.

auto-immuunziektes heeft in gebieden waar veel parasitaire wormen voorkomen in vergelijking tot mensen uit een Westerse samenleving. De hypothese is dat een wormeninfectie vroeg in het leven helpt bij het trainen van ons afweersysteem, wat bijdraagt aan de optimale demping van afweerreacties, iets waar het bij mensen met allergieën of autoimmuniteit aan schort. Een vraag binnen wetenschappelijk onderzoek is: kunnen we begrijpen hoe de wormen ons afweer sturen en/of remmen, en kunnen we dit nabootsen met moleculen? Dan kunnen we de ontwikkeling van immuunziektes zoals allergieën en auto-immuniteit verminderen of voorkomen zonder dat mensen met parasieten geinfecteerd hoeven te zijn (geweest). Daarnaast kan kennis over de overlevingsstrategieën van de parasiet ook helpen bij het vinden van nieuwe behandelingen tegen de parasiet zelf. Een infectie met *Schistosoma* kan tegenwoordig goed behandeld worden met medicatie, maar mensen kunnen opnieuw geïnfecteerd raken omdat ze zelden afdoende immuniteit ontwikkelen en er nog geen vaccin is. Er wordt al veel onderzoek gedaan naar de losse moleculen die de *Schistosoma* parasieten uitscheiden en wat voor effect ze hebben op onze afweer, maar dit heeft nog niet geleid tot een therapie tegen afweerziektes. Meer recent is ontdekt dat de parasieten ook hele pakketjes met moleculen uitscheiden en hier is nog maar beperkt onderzoek naar gedaan.

Alle cellen in ons lichaam communiceren met elkaar. Dit kan door middel van direct cel-cel contact, bijvoorbeeld hoe een afweercel checkt of een andere cel nog gezond, juist ziek of geïnfecteerd is. Een tweede manier van communicatie tussen cellen is via uitgescheiden losse (signaal)moleculen, zoals bijvoorbeeld hormonen. Een derde manier van communicatie tussen cellen is via extracellulaire (uitgescheiden) blaasjes ("extracellular vesicles" in het Engels, afgekort EVs). Deze EVs zijn hele pakketjes met moleculen die worden omringd door eenzelfde membraan als een cel, en ze kunnen op twee verschillende manieren door een cel worden uitgescheiden. Vergeleken met een cel zijn ze nog 100 keer kleiner: tussen de 50 en 200 nanometer (Figuur 2). Hun kleine omvang maakt het uitdagend om er onderzoek naar te doen want er zijn speciale technieken nodig om ze te isoleren en te meten. Het voordeel van communicatie tussen cellen via EVs is dat er in één keer veel informatie van de ene cel naar de andere cel kan worden doorgegeven. Je zou het kunnen vergelijken met het opsturen van een pakketje via de post in plaats van een kaart: met het pakketje kun je veel meer delen met de ontvanger. En net als postpakketjes zijn EVs heel verschillend in omvang en lading, zelfs als ze van dezelfde cel afkomstig zijn. Deze EVs worden door cellen van bijna alle organismen uitgescheiden, van zoogdieren tot planten. En we weten dus sinds een tiental jaren dat parasieten ook dit soort EVs uitscheiden.



Figuur 2. Een indicatie van afmeting van de organismen, cellen en extracellulaire blaasjes (EVs) onderzocht in dit proefschrift.

Volwassen *Schistosoma*-wormen zijn tussen de 6 en 17 mm en de larven tussen de 100 en 250 µm. Menselijke afweercellen, zoals een B-lymfocyt en dendritische cel (DC) zijn respectievelijk 8-10 µm en 10-15 µm. EVs worden door cellen uitgescheiden en zijn tussen de 50-200 nm.

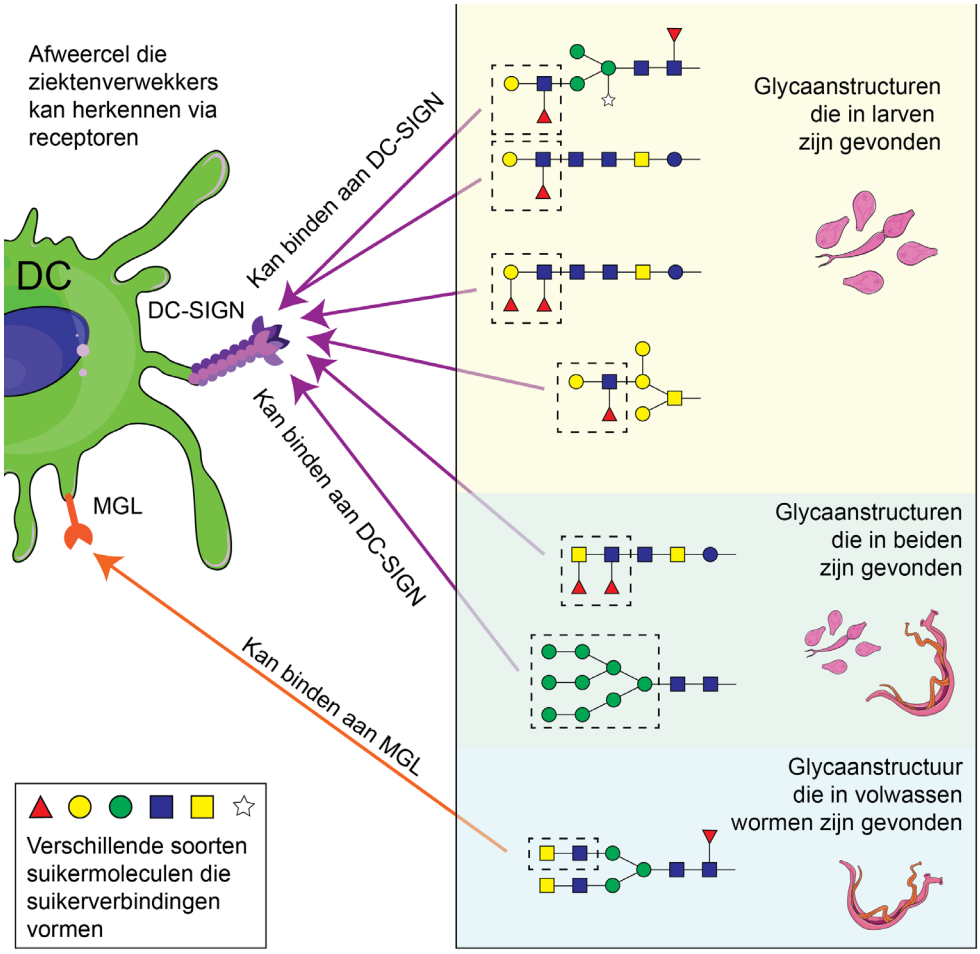
A

Maar er is nog weinig bekend over de communicatie van de parasieten EVs naar onze afweercellen en wat voor effecten ze teweegbrengen op deze cellen.

Voor het verdere begrijpen van het onderzoek in dit proefschrift is ook nog de introductie van glycosylering en glycanen nodig. Glycosylering is het proces waarbij suikerketens worden gebonden aan eiwitten of lipiden (vetzuren). Deze suikerketens (glycanen) spelen een belangrijke rol in veel biologische processen en zijn essentieel voor de structuur en functie van veel moleculen in levende organismen. Ook moleculen van parasieten, bacteriën en schimmels bevatten glycanen. De afweercellen die een grote rol spelen bij het opsporen van indringers hebben vele verschillende receptoren (dat zijn moleculen, vaak op het celoppervlak, die specifieke andere moleculen herkennen via een 'sleutel-slot' principe) die glycanen van eigen cellen of van ziekteverwekkers kunnen herkennen. Het type receptor dat wordt geactiveerd heeft uiteindelijk invloed op de afweerreactie die volgt. Er zijn receptoren die de reactie activeren (om ziekteverwekkers te vernietigen) maar ook receptoren die een afweerreactie afremmen. Voor *Schistosoma*-parasieten weten we dat elk levensstadium (larven, volwassen wormen en eieren) een eigen samenstelling heeft van de glycanen die ze produceren (Figuur 3). We weten ook welke receptoren deze glycanen mogelijk kunnen herkennen en het is ook bekend dat elk levensstadium weer andere afweerreacties in de gastheer teweegbrengt. Maar er is amper kennis over de glycosylering van de EVs van de parasiet en of deze glycanen een rol spelen in de interactie van deze pakketjes met receptoren op de afweercellen.

In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar de EVs van de *Schistosoma mansoni* parasiet, welke glycanen deze pakketjes bevatten, en wat voor invloed de EVs van deze parasiet hebben op afweercellen. De introductie (**hoofdstuk 1**) geeft een korte inleiding van de onderwerpen en hoofdstukken in dit proefschrift. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van wetenschappelijk gepubliceerde onderzoeken over specifieke moleculen die gevonden zijn in EVs van bacteriën, parasieten en schimmels waarbij een effect op het afweersysteem is aangetoond.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een geoptimaliseerde methode om de EVs die gekweekte *Schistosoma*-parasieten uitscheiden te isoleren. Om iets te kunnen zeggen over een effect van EVs is het belangrijk deze te scheiden van andere losse moleculen die tegelijkertijd uitgescheiden worden door de parasiet, zoals groepen 'losse' eiwitten. Voor de scheiding zijn twee methodes vergeleken: scheiden op grootte en scheiden op dichtheid. Hierbij kwamen we erachter dat een afbraakproduct van de bloedconsumptie van de wormen even klein kan zijn als de EVs zelf, dus dat we deze niet konden scheiden op grond van grootte. Met behulp van een dichtheidsgradiënt konden de EVs wel gescheiden worden van de bloedproducten en andere losse eiwitten, omdat de EVs een andere dichtheid



Figuur 3. Glycanen die gevonden zijn in volwassen wormen en larven van *Schistosoma mansoni* en door welke receptor ze herkend kunnen worden.

De larven en volwassen wormen verschillen in glycanen profiel. De structuren hier rechts weergegeven zijn slechts een klein deel van alle structuren die eerder gerapporteerd zijn. De glycaanstructuren (suikerbindingen) die herkend worden door de desbetreffende receptor staan binnen de gestreepte vakjes. DC-SIGN en MGL zijn receptoren die op cellen van het afweersysteem zitten die een belangrijke functie hebben in het herkennen van ziekteverwekkers. De dendritische cel (DC) is zo'n afweercel.

hadden. Hierbij zijn twee soorten dichtheidsgradiënten vergeleken, waarvan er één was die zowel EVs van volwassen wormen als de EVs van de larven goed kon scheiden van hun niet-EV-materiaal. Vervolgens hebben we de dichtheidsgradiënt verder geoptimaliseerd naar een kleiner volume om zo het gebruik van laboratoriumproducten en verwerkingstijd te verminderen. We laten zien dat dit uiteindelijk zorgt dat er minder EVs verloren gaan tijdens de isolatie. Hierdoor kunnen we uiteindelijk meer experimenten doen met hetzelfde kweekmateriaal van de parasieten. Omdat voor het behoud van de levenscyclus van de parasiet een gastheer essentieel is en hiervoor proefdieren noodzakelijk zijn, is het dus een grote winst dat we met onze geoptimaliseerde methode meer EVs overhouden om onderzoek mee te doen.

In **hoofdstuk 4** laten we zien dat de EVs van de volwassen *Schistosoma*-wormen glycanen bevatten. De glycanen van zowel de buiten- als binnenkant van deze worm EVs zijn in detail in kaart gebracht. Bij het vergelijken van een aantal glycaanstructuren op/in EVs van volwassen wormen en de larven zagen we dat er duidelijke verschillen waren tussen de twee levensstadia. De glycanen aan de buitenkant van de volwassen wormen EVs gaven de suggestie dat ze met een specifieke receptor, de MGL, zouden kunnen binden. Dit hebben we getest met behulp van cellen die genetisch gemodificeerd zijn en daardoor veel van deze MGL-receptor op hun celoppervlak hebben. We hebben de interactie van de volwassen wormen EVs met deze cellen vergeleken met cellen die een andere receptor, DC-SIGN, op hun celoppervlak hebben. De DC-SIGN-receptor bindt aan een andere glycaanstructuur dan de MGL-receptor. Deze vergelijking liet zien dat de EVs van de volwassen wormen inderdaad veel meer interactie hadden met de cellen die de MGL-receptor hadden dan de cellen met de DC-SIGN-receptor. Deze studie laat dus zien dat er glycanen op het oppervlak van de parasiet EVs zitten en dat deze glycanen een belangrijke rol kunnen spelen voor de interactie met gastheercellen.

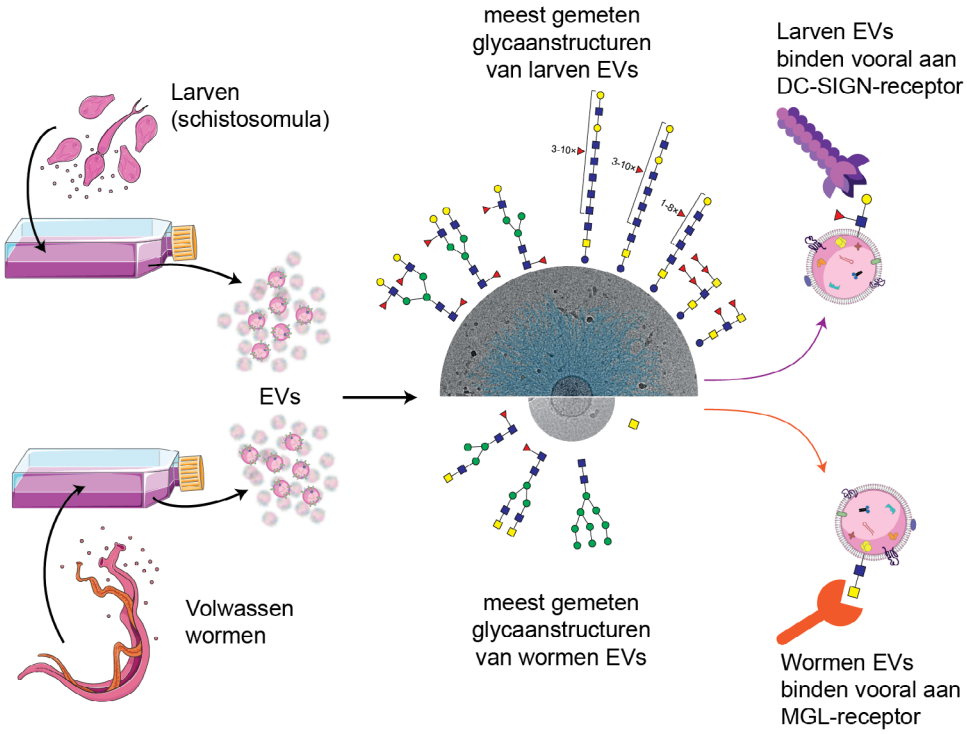
Vervolgens hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht wat voor effect de EVs van de volwassen wormen hebben op een specifieke afweercel, de B-lymfocyt. Deze cel zorgt voornamelijk voor de uiteindelijke productie van antistoffen tegen ziekteverwekkers, maar kan ook een rol spelen in het versterken of dempen van afweerreacties door signaalmoleculen uit te scheiden. Een van deze signaalmoleculen, genaamd cytokines, vertellen andere afweercellen om in de aanval te gaan of juist niet. Een voorbeeld van cytokines die aanzetten tot een sterkere afweerreactie zijn IL-6 en IL-12 en een cytokine die juist een afweerreactie kan dempen is IL-10. In dit hoofdstuk laten we zien dat wat de volwassen wormen uitscheiden in het kweekmedium (hun gehele secretiemateriaal) zorgt voor het aanmaken en uitscheiden van IL-10 door B-lymfocyten van muizen. Geïsoleerde

EVs van de wormen konden ook een IL-10-reactie in deze cellen stimuleren. Daarnaast hebben we ook gekeken naar de effecten op B-lymfocyten die uit bloed van gezonde mensen zijn geïsoleerd. Hierbij zagen we zowel IL-10 als IL-6 productie door de cellen als we deze cellen samen kweekten met worm EVs. Deze studie laat zien dat de wormen zowel EVs als andere moleculen uitscheiden die beiden een effect hebben op B-lymfocyten. We laten zien dat er interactie is van de worm EVs met de B-lymfocyten en dat dit mogelijk een dempende rol op afweerreacties heeft.

Hoofdstuk 6 beschrijft de studie waarin we de EVs van de larven van *Schistosoma mansoni* onderzoeken. Hierbij hebben we, net als voor de volwassen wormen in hoofdstuk 4, de glycanen aan de buiten- en binnenkant in kaart gebracht. Waar we voor de worm EVs alleen glycanen aan eiwitten hebben kunnen detecteren, vinden we voor de larven EVs ook veel glycanen aan lipiden. Verder hebben we ontdekt dat de EVs van de larven lange haarachtige structuren op hun oppervlak hebben. Dit hebben we met een elektronenmicroscoop in beeld kunnen brengen. Wat deze structuren precies zijn en wat hun rol is, dat moet nog verder worden onderzocht. De glycaanstructuren die we het meeste vonden op de EVs van de larven binden met name aan de DC-SIGN-receptor. Deze receptor wordt veel tot expressie gebracht op dendritische cellen (DCs). De DC is belangrijk voor de herkenning van ziekteverwekkers, het communiceren met andere afweercellen en het aanzetten of afremmen van verschillende afweerreacties. De DCs hebben we verkregen door monocyten (een ander type witte bloedcel) uit bloed van gezonde mensen te isoleren en in het laboratorium zodanig te veranderen dat ze op DCs lijken. We zagen dat deze monocyte-afkomstige DCs (ofwel moDCs) na interactie met EVs van larven meer signaalstoffen (de cytokines) gingen uitscheiden, zoals IL-6, IL-12 en IL-10. Na het blokkeren van de DC-SIGN receptor op de moDCs veranderde de afgifte van deze cytokines als reactie op de EVs, maar deze verandering (meer of minder) was anders tussen de verschillende bloeddonoren. Uit deze studie kunnen we concluderen dat de EVs die de *Schistosoma*-larven uitscheiden een versterkend effect hebben op afweerreacties, maar dat dit zowel activerend als dempend zou kunnen zijn. Dit is mogelijk een mechanisme waarmee de parasiet voorkomt dat er een hele sterke afweerreactie tot stand komt zodra de larve de huid binnendringt. De glycanen op de EVs en de interactie met de DC-SIGN-receptor spelen hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol hierbij.

Tot slot wordt in de discussie (**hoofdstuk 7**) een samenvatting gegeven van het onderzoek beschreven in dit proefschrift. Daarnaast worden in dit hoofdstuk ook suggesties gedaan voor toekomstig onderzoek naar *Schistosoma* EVs om uiteindelijk meer te weten te komen over hoe de parasieten met hun gastheer communiceren via EVs.

In conclusie: het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat zien dat EVs uitgescheiden door volwassen wormen en larven van de parasiet *Schistosoma mansoni* glycanen bevatten. Deze glycanen spelen een rol in de interactie van de EVs met afweercellen van de gastheer. Het is aannemelijk dat deze EVs een belangrijke functie hebben tijdens een infectie van de (menselijke) gastheer, maar dit zal verder onderzocht moeten worden. Uiteindelijk kan de verkregen informatie ons helpen bij het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor de preventie en behandeling van immuunziektes.



Figuur 4. Visuele samenvatting van een selectie bevindingen die worden gepresenteerd in dit proefschrift.

Geïsoleerde extracellulaire blaasjes (EVs) van *Schistosoma*-larven en volwassen wormen zijn gemeten op hun bevattende glycaanstructuren. De EVs van de verschillende levensstadia verschillen in glycanen en ook in uiterlijk (morfologie): de elektronenmicroscoop plaatjes in het midden laten zien dat larven EVs haarachtige structuren bevatten (handmatig blauw ingekleurd) die niet zichtbaar zijn voor de wormen EVs. Tot slot hebben we laten zien dat de glycaanstructuren bepalend zijn voor de interactie met receptoren. De EVs van de larven binden vooral aan de DC-SIGN-receptor, terwijl de volwassen wormen EVs vooral binden aan de MGL-receptor.