

Samenvatting in het Nederlands

Inleiding

Dictyocaulus viviparus (longworm) is de veroorzaker van parasitaire bronchitis bij het rund. De worm behoort tot de superfamilie van de Trichostrongyloidea binnen het phylum Nematoda (rondwormen). De volwassen longwormen zijn van gescheiden geslacht en leven als enige parasitaire nematode in de longen van runderen. De vrouwtjes produceren eieren die zich binnen 24 uur tot eerste stadium larven (L1) ontwikkelen. De eieren en L1's worden door de gastheer opgehoest en ingeslikt, waarna ze worden uitgescheiden met de faeces. Daar vindt de ontwikkeling plaats tot het infectieuze 3^e stadium (L3). Deze L3 larven kruipen in de sporangiofoor van de schimmel *Pilobolus* en deze verspreidt zijn sporen samen met de larven over het grasland. Na het eten van besmet gras penetreren de opgenomen larven de darmwand van het rund en migreren via de mesenteriele lymfeklieren en de bloedcirculatie naar de longen, waar ze zich ontwikkelen tot volwassen wormen. Ongeveer 24 dagen na het opnemen van de larven beginnen de dan volwassen wormen met het produceren van eieren en kan de levenscyclus zich weer herhalen.

De pathologie van longworminfecties wordt veroorzaakt door de stadia die zich in de longen bevinden: eieren, L1 en ontwikkelende en volwassen wormen. De aanwezigheid van wormen induceert een influx in de longen van cellen van het immuunsysteem, met name eosinofielen. Deze cellen blokkeren de luchtpassage naar de alveolen (longblaasjes) en hierdoor klappen de alveolen in. Voorts komen door activeren van eosinofielen maar ook andere aanwezige cellen van het immuunsysteem zoals mast cellen (mast cells), toxische stoffen vrij die zijn bedoeld om pathogenen uit te schakelen. Bij een overmatige reactie kunnen deze stoffen echter ook de lichaamseigen cellen beschadigen. Het tekort aan zuurstof

veroorzaakt door de beschadiging van de alveolen kan leiden tot hart falen, waardoor de gasuitwisseling in de longen nog verder verslechterd. Bij ernstige worminfecties kan de dood van de gastheer intreden nog voordat de wormen volwassen zijn.

Momenteel worden longworm- en andere nematoden infecties veelal bestreden met anti-worm middelen (anthelmintica). Het grote nadeel hiervan is dat resistentie tegen alle groepen van anthelmintica tegenwoordig wijd verspreid is en nog steeds toeneemt. Hoewel anthelminticum resistentie bij longwormen nog niet ondubbelzinnig is vastgesteld, zou vaccinatie een betere oplossing zijn. Er is al meer dan 40 jaar een vaccin tegen *D. viviparus* op de markt (Huskvac, Intervet). Dit is het enige commercieel verkrijgbare vaccin tegen een parasitaire nematode. Het vaccin bestaat uit L3 larven die zijn verzwakt door bestraling. Deze larven leven lang genoeg om immuniteit te genereren, maar te kort om ziekte te veroorzaken. Er zijn echter belangrijke nadelen verbonden aan dit levende vaccin zoals de noodzaak om donorkalveren te gebruiken voor de productie, de korte houdbaarheid van het vaccin, en het onvermogen van dit vaccin om immunologisch geheugen te induceren. Hierdoor is een booster infectie in de vorm van een natuurlijke infectie op het weiland nodig. Ook zijn de bestanddelen van het vaccin die bescherming geven onbekend. Vanwege deze nadelen is de ontwikkeling van een nieuw vaccin met een gedefinieerde samenstelling en bereid zonder tussenkomst van dieren, wenselijk.

Antilichamen (immunoglobulinen, Ig) spelen een belangrijke rol bij de immuniteit tegen *D. viviparus*. Dit is aangetoond met passieve immunisatie: door het inspuiten van serum van immune kalveren naar naieve kalveren kon bescherming tegen infectie worden overgebracht. De specificiteit en het Ig isotype van de beschermende antilichamen is echter niet bekend. Veel van de antilichamen die tegen de worm zijn gericht zullen geen effect hebben op de parasiet, bijvoorbeeld omdat ze gericht zijn tegen antigenen die bij levende wormen niet op

het oppervlak liggen en dus niet toegankelijk zijn voor het immuunsysteem. Excretie/secretie (ES) producten van parasitaire nematoden bevatten veelal eiwitten met essentiële enzymatische functies of eiwitten afkomstig van de oppervlakte van de worm. Deze eiwitten zijn vaak immunogeen en vaccinatie met ES van diverse parasitaire nematoden geeft gedeeltelijke bescherming tegen infectie.

Het belangrijkste doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het ontdekken van componenten van de longparasiet die bescherming kunnen geven tegen infectie en dus onderdeel zouden kunnen zijn van een nieuw veilig, effectief, en diervriendelijk geproduceerd vaccin. Aangezien de herkenning door antilichamen is gecorreleerd met bescherming tegen infectie, is eerst het ontstaan van antilichamen gericht tegen ES producten tijdens natuurlijke *D. viviparus* infectie onderzocht (Hoofdstuk 2). Vervolgens zijn het isotype en de specificiteit van de antistoffen die worden geïnduceerd tijdens de natuurlijke infectie en na vaccinatie onderzocht (Hoofdstuk 3). Potentieel interessante componenten van de parasiet die werden herkend door de antilichamen zijn geïdentificeerd, gezuiverd en onderzocht op mogelijk immunomodulerende eigenschappen (Hoofdstuk 4). Een voor vaccinontwikkeling veelbelovend antigeen (GP300) is vervolgens gekloneerd, gelokaliseerd, en vergeleken met soortgelijke eiwitten in andere nematoden (Hoofdstuk 5).

De humorale immune response tegen ES in geïnficeerde kalveren

Van alle Ig isotypes bij het rund (IgA, IgE, IgG1, IgG2 en IgM) is IgE het sterkst geassocieerd met parasitaire infecties. In serum komt IgE in zeer lage concentraties voor, maar is toch van groot belang omdat het bindt aan IgE receptoren met hoge affiniteit (FcεRI) die voorkomen op mest cellen en geactiveerde eosinofielen. Omdat er geen methode beschikbaar was om runder (bovine) IgE eenvoudig te bepalen, zijn eerst bovine IgE-specifieke poly- en monoklonale antilichamen

geproduceerd (Hoofdstuk 2). De nieuw ontwikkelde bovine IgE assay werd vervolgens gevalideerd en gebruikt om IgE hoeveelheden te meten in de sera van geïnfecteerde runderen in twee onafhankelijk experimenten. Zoals beschreven in Hoofdstuk 2 werd in beide experimenten een positieve correlatie gevonden tussen de hoeveelheid totaal IgE in serum en bescherming tegen *D. viviparus* infectie. Parasiet specifiek IgE kon alleen worden gedetecteerd in dieren met een hoge immuniteit. In dieren uit dezelfde groep met een lage immuniteit kon geen parasiet specifiek IgE worden aangetoond. Voor wat betreft de andere Ig klassen werd slechts voor IgG1 en IgG2 op 1 dag in het verloop van de infectie een positieve correlatie gevonden tussen de Ig titers en bescherming. Het beschermende IgE bleek vooral te reageren met een eiwit met een hoog moleculair gewicht, GP300.

Parasitaire glycoproteïnen als antigenen in geïnfecteerde en gevaccineerde kalveren

Nader onderzoek naar de aard van de antigenen die werden herkend door de Ig tijdens een eerste en tweede infectie richtte zich op zowel parasitaire eiwitten als de aan sommige eiwitten gekoppelde suikers of andere moleculen (Hoofdstuk 3). Hiertoe werd de immuun respons gemeten tegen het volledige antigeen, maar ook na deglycosylering van de ES of L3 fracties. De gebonden glycanen werden verwijderd door behandeling met PNGaseF. Dit enzym verwijderd alle N-gebonden glycanen die geen core $\alpha(1,3)$ fucosylering hebben. Om een beter onderscheid te maken tussen de immuun response na een eerste infectie en de booster response door een tweede infectie werd de Ig gemeten in sera van dieren die met een grotere tussenpoos waren geïnfecteerd dan die beschreven in Hoofdstuk 2.

Na primaire infectie en ook na vaccinatie bleken de N-glycanen de dominante epitopen voor alle Ig isotypen behalve IgM. Vooral GP300 werd zeer sterk herkend ondanks de relatief lage expressie van het eiwit. Na herinfectie van

de dieren bleek dat er geen booster response optrad tegen het glycaan deel, maar wel tegen het eiwit deel. Deze booster respons werd alleen gezien voor IgG1 en IgE. Dit suggereert dat alleen voor deze isotypen immunologisch geheugen was ontstaan. Opvallend was dat de kalveren die werden gevaccineerd met bestraalde L3 larven (waarvan bekend is dat dit geen immunologisch geheugen induceert) ook geen IgG1 en/of IgE boosterreactie ontwikkelden. Het gedeglycosyleerde eiwit in ES dat het best herkend werd na herinfectie, maar niet na vaccinatie was een 67 kDa protein. Dit is waarschijnlijk het acetylcholinesterase (AChE), een potentiële vaccincomponent waarvan bekend is dat het wel na infectie, maar niet na vaccinatie wordt herkend.

Karakterisering van GP300

Gezien de mogelijke geschiktheid van GP300 als bestanddeel van een nieuw vaccin tegen *D. viviparus*, werd het glycoproteïne gezuiverd en nader gekarakteriseerd (Hoofdstuk 4). GP300 reageerde met het lectine WGA. Dit wees op de aanwezigheid van N-acetylglucosamine (GlcNAc). GP300 was het enige (glyco)proteïne in volwassen wormen dat reageerde met WGA. Hierdoor was het mogelijk vrijwel 100% zuiver GP300 te isoleren uit het wateronoplosbaar extract van volwassen longwormen door middel van lectine affiniteitschromatografie.

Verrassend was dat GP300 niet alleen één of meerdere suikerketens had, maar ook een aan deze keten gekoppelde phosphorylcholine (PC) groep. De aanwezigheid hiervan kon worden aangetoond met PC-specifieke antilichamen. Wellicht nog interessanter was dat in de *D. viviparus*-geïnfecteerde dieren PC de immunodominante epitoop van GP300 was, maar dat de IgG respons hiertegen niet correleerde met bescherming in tegenstelling tot de veel lagere IgE response. Wetende dat PC ook veel voorkomt bij de gastheer, bracht deze bevinding ons op de hypothese dat de door de parasiet opgewekte PC-specifieke antilichamen

wellicht zouden kunnen kruisreageren met soortgelijke moleculen van het rund. Dit kon worden aangetoond voor de ontstekingsmediator platelet-activating factor (PAF). PAF heeft een belangrijke functie o.a. in stimuleren van eosinofilie en de productie van IgG2. Op grond van deze bevindingen kan worden verondersteld dat de anti-PC antilichamen die ontstaan tijdens een *D. viviparus* infectie en die kruisreageren met PAF, leiden tot een neutralisatie van PAF functie en dus een verminderde eosinofilie en IgG2 productie. Dit is precies wat waargenomen wordt bij ernstig geïnfekteerde runderen die hoge anti-PC titers hebben op het moment van herinfectie. De PC-specifieke IgG antilichamen zouden aldus enerzijds tot een verminderde effectiviteit van de immuun respons van de gastheer kunnen leiden (door verminderde IgG2 productie), maar tegelijkertijd ook de gastheer kunnen beschermen tegen ernstige pathologie door het neutraliseren van PAF-geïnduceerde ontstekingsmediatoren.

Identificatie en karakterisering van peptide-keten van GP300

PC is alleen aanwezig op GP300 (hoofdstuk 4) en de IgE respons tegen GP300 correleert met bescherming tegen infectie (Hoofdstuk 2). Hierom is het eiwit gedeelte van GP300 verder onderzocht (Hoofdstuk 5). Massa spectrometrie toonde aan dat GP300 veel overeenkomsten vertoonde met een eiwit van *Haemonchus contortus*, de grote lebmaag worm van schaap en geit. Dit eiwit bevat een aantal thrombospondine en Kunitz domeinen en heeft de benaming *H. contortus* thrombospondine (TSP) meegekregen. Op basis van deze homologie kon het gen dat codeert voor GP300 worden gekloneerd en gesequenced. Dit toonde aan dat GP300 eveneens een aantal thrombospondine- en Kunitz-domeinen bevat, alsmede een signaalpeptide, maar vrijwel zeker geen transmembraan domein. Dit past bij de suggestie dat GP300 een extracellulair matrix (ECM) proteïne is. Immunohistologie toonde aan dat in de volwassen worm GP300 is gelokaliseerd in de

hypodermis, de bekleding van de uterus en de brushborder van de darm, net als bij *H. contortus*. De verwantschap tussen GP300 en TSP van *H. contortus* kon verder worden bevestigd door de reactiviteit van antilichamen opgewekt tegen recombinant *H. contortus* TSP (anti-rHc-TSP) met GP300. Voorts bleken de PC-specifieke antilichamen en het lectine WGA die beide reageren met PC300, eveneens te reageren met *H. contortus* TSP en ook met mogelijke verwante proteïne in andere nematoden. Dit wijst erop dat niet alleen GP300, maar ook soortgelijke eiwitten in andere nematoden PC-bevattende glycanen kunnen hebben.

Conclusies en toekomstig onderzoek

De in dit proefschrift beschreven resultaten hebben enkele belangrijke nieuwe inzichten opgeleverd. De bevinding dat IgE titers sterk correleren met de bescherming tegen *D. viviparus* infectie geeft de mogelijkheid de mate van bescherming van runderen tegen longworm te bepalen. Het bestaan van een immuun respons, maar achterwege blijven van een booster respons na vaccinatie, kan de beperkte werking van het huidige vaccin verklaren. De bevinding dat na herinfectie wel een booster respons (IgG1 en IgE) optreedt die gecorreleerd is met bescherming tegen infectie en die vooral gericht is tegen de peptide-keten van o.a GP300, kan erop wijzen dat de eiwitgedeelte van GP300 van groot belang kan zijn voor de ontwikkeling van een vaccin. Het hier beschreven succes met het kloneren van het gen dat codeert voor GP300 en het bepalen van de gensequentie zijn belangrijke stappen in het ontwikkelen van een recombinant eiwit als onderdeel van een toekomstig vaccin. Vaccinatie experimenten met GP300 zullen uit moeten wijzen of dit glycoproteïne inderdaad tot (door IgE gemedieerde) bescherming leidt.

De bevinding dat PC aanwezig is op GP300, dat dit molecuul sterk immundominant is, en dat opgewekte PC-specifieke antilichamen kruisreageren

met de belangrijke onstekingsmediator PAF, geeft een nieuwe dimensie aan het denken over de pathogenese van *D. viviparus* infectie. Sterker nog, het feit dat de PC-specifieke antilichamen kruisreageren met PC op andere nematoden zou kunnen wijzen op een nieuw universeel mechanisme via welke wormen er tijdens de evolutie in geslaagd zijn hun gastheer te koloniseren zonder ernstige schade toe te brengen. Dit zou nader kunnen worden bevestigd door experimenten uit te voeren met intact en met gedeglycosyleerd GP300. Er zal dan niet alleen gekeken moeten worden naar het effect op de wormlast, maar ook naar ontstekingsparameters (eosinofilie, IgG2, acute phase proteins, adenalings frequentie). De verwachting is dat deze verlaagd zullen zijn na vaccinatie met het intacte GP300, maar niet na vaccinatie met het gedeglycosyleerde GP300. Mogelijk zal vaccinatie met GP300 niet resulteren in lagere worm aantallen, maar wel in afname van de symptomen. De vergelijking dringt zich hier op met *Dictyocaulus arnfieldi*, een verwante soort die ezels en paarden infecteert. Ezels hebben doorgaans grote aantallen van deze wormen in hun longen zonder klinische verschijnselen, terwijl deze soort voor paarden zeer pathogeen is. Er wordt aangenomen dat de ezel de oorspronkelijke en dus oudste gastheer van deze parasiet is en blijkbaar heeft de evolutie er voor “gekozen” om de nadelige gevolgen van de infectie tegen te gaan in plaats van afweer tegen de parasiet op te bouwen. Als dit gerelateerd is aan PC en/of anti-PC, dan is het verschil tussen naieve en GP300 gevaccineerde runderen vergelijkbaar met het verschil tussen paarden en ezels.