

University of Groningen

Innate and adaptive immune effects of chicory root dietary fibers

Vogt, Leonie

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Vogt, L. (2015). *Innate and adaptive immune effects of chicory root dietary fibers*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De huidige consensus over gezonde voeding is dat voldoende dagelijkse inname van voedingsvezel kan beschermen tegen het ontwikkelen van verschillende Westerse ziekten. De precieze mechanismen waardoor deze bescherming gemedieerd wordt, zijn op dit moment nog onbekend, maar de effecten op het immuunsysteem lijken hierbij een rol te spelen. Als belangrijk onderdeel van het lichaam is het immuunsysteem verantwoordelijk voor homeostase, door het lichaam te beschermen tegen pathogenen. Bovendien is het belast met de taak om juist de commensale micro-organismen in onze darmen te tolereren, omdat deze een belangrijk onderdeel van ons verteringsstelsel vormen. De darmen worden wel gezien als het belangrijkste immunologische orgaan van het lichaam omdat ca. 70 procent van alle immuuncellen van het lichaam zich in de darm bevinden. Het darm immuunsysteem is constant actief bezig de inhoud van de darmen te ‘samplen’ om de status van het darm lumen te monitoren en goede signalen in de vorm van commensale microbiota soorten te onderscheiden van schadelijke pathogene micro-organismen en toxinen. Naast deze continue surveillance door gespecialiseerde immuuncellen, spelen ook epitheelcellen een belangrijke rol in darm homeostase. Door de sterke ononderbroken laag van epitheelcellen wordt voorkomen dat het externe milieu (waar het darm lumen ook onderdeel van is), kan doordringen in het omliggende weefsel van de lamina propria. Wanneer de darminhoud aanhoudend naar het omliggende weefsel kan lekken en ook in de rest van het lichaam terecht kan komen vanwege een defecte darmepitheel laag, noemt men dit het ‘leaky gut syndroom’. Het ontstaan van verscheidene ziekten is reeds gelinkt aan dit ongewenste fenomeen en de ontdekking van betrokkenheid in de etiologie van nog meer soorten ziekten ligt in de lijn der verwachting. Dit benadrukt het belang van een goede darmbarrière in de preventie van ziekten. Functional foods zoals prebiotische voedingsvezels hebben als doel om een gezonde darm microbiota te bevorderen door selectief de groei en activiteit van lactobacillen en bifidobacteriën te stimuleren, wat op hun beurt weer de gezondheid van de gastheer bevordert. Naast de indirecte gezondheidseffecten via bacteriën en hun korte keten vetzuur fermentatieproducten stellen wij dat er een derde mechanisme is waardoor voedingsvezels immuunmodulatie kunnen bewerkstelligen, namelijk door direct membraan receptoren op immuuncellen en epitheelcellen te activeren. Ondanks dat er een collectief gezondheids bevorderend effect wordt beschreven in de literatuur, zijn de mechanismen waardoor individuele vezelsoorten hun gezondheidseffecten induceren nog onbekend. De studies beschreven in

dit proefschrift zijn er met name op gericht om directe effecten van verschillende voedingsvezeltypen uit cichoreiwortel te identificeren en te karakteriseren.

Cichoreiwortel staat bekend om het hoge gehalte van inuline-type fructanen, een van de meest bekende en bestudeerde soorten van prebiotische vezels. In **Hoofdstuk 1** wordt een literatuur overzicht gegeven van de huidige kennis van immuun gemedieerde gezondheidseffecten door inuline-type fructanen. De onderzoeken waarbij deze vezels werden toegepast in de context van colon kanker, chronische ontstekingsziekten, vaccinatie studies, en infectie-, en allergie preventie, hebben geleid tot een grote verzameling wetenschappelijke bewijzen van immuunmodulerende effecten. Deze fructanen zijn hierdoor voedselcomponenten die veelbelovend zijn in de preventie van ziekten. Bij toekomstige studies over de immunologische effecten van inuline-type fructanen en andere voedingsvezels wordt aanbevolen om de keuze van immuunmarkers te correleren aan de specifieke aandoening die onderzocht wordt, en dat de relevante klinische eindpunten duidelijk worden beschreven. Bij patiëntenstudies is het noodzakelijk om aan te geven of de immuunmarkers verschillend tot expressie worden gebracht in de patiëntenpopulatie ten opzichte van de controlegroepen. Vanwege het huidige gebrek aan wetenschappelijk bewijs voor directe effecten is onderzoek nodig waarbij wordt aangetoond dat inuline-type fructanen en andere voedingsvezels directe immuunmodulatie kunnen veroorzaken door activatie van dendritische cellen (DCs) of andere immuuncellen in de darm. De hypothese van dit proefschrift luidt dan ook "Door receptoren van het aangeboren immuunsysteem zoals Toll-like receptoren (TLRs) en Nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins (NODs) te activeren kan inname van voedingsvezels substantiële effecten hebben op zowel het darm immuunsysteem als immuuncellen in de periferie. Daarnaast kunnen voedingsvezels de darmbarrière beïnvloeden door activatie van dezelfde receptoren die zich op het darmepitheel bevinden".

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we dat inuline-type fructans voor directe activatie kunnen zorgen bij contact met immuuncellen en behandelen we de rol die TLRs en NODs spelen in dit proces. Humane mononucleaire cellen uit perifeer bloed (PBMCs) werden bestudeerd als model immuuncellen, omdat deze cellen veel PRRs tot expressie brengen, zoals TLRs en NODs. Door te stimuleren met inuline-type fructanen werd de cytokine productie in PBMCs gestimuleerd. Naast dit bewijs voor

directe activatie, bleken de patronen van cytokine productie ook afhankelijk van de gebruikte dosis, en bovendien van de gemiddelde ketenlengte van de fructanen. Een opvallend resultaat was dat korte keten-verrijkte inuline een regulatoire cytokinebalans induceerden vergeleken met lange keten verrijkte inuline, uitgedrukt in een respectievelijk hoge vs. lagere IL-10/IL12 ratio.

Experimenten met TLR reporter cellen lieten zien dat fructan-gemedieerde activatie sterk afhankelijk is van TLRs en het TLR adapter molecuul Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88). Uit vervolgentoelagen met reporter cellen die slechts één type TLR per cellijn tot overexpressie brengen, kunnen we concluderen dat TLR2 sterk geactiveerd werd, maar dat TLR4, 5, 7, 8, en NOD2 slechts in kleine mate geactiveerd werden. Deze resultaten bevestigen dat inuline-type fructans inderdaad directe activatie kunnen veroorzaken in humane immuuncellen, en dat deze activatie afhankelijk is van dosis, ketenlengte en voornamelijk verloopt via TLR2. TLR2 is een belangrijke receptor die betrokken is bij homeostase van de darmbarrière. De waarneming dat van alle TLRs, TLR2 voornamelijk betrokken is in inuline-type fructan herkenning leidde ertoe te onderzoeken of deze vezels de darmbarrière verbeteren of beschermen. De hypothese voor dit onderzoek hield in dat receptor interacties met TLR2 op de oppervlakte van darm epitheelcellen betrokken zijn bij darmbarrière modulatie door inuline-type fructans en dat ketenlengte ook in dit proces een rol speelt in de uitkomst van epitheel stimulatie. Tight junctions zijn verbindingpunten tussen epitheelcellen die de barrière waarborgen. TEER is een parameter die vaak wordt gebruikt om de tight junction-gemedieerde barrière functie te bestuderen. In **Hoofdstuk 3** wordt een model voor schade aan de darmbarrière geïntroduceerd dat gebaseerd is op het gebruik van PMA, wat een aanzienlijke daling in de weerstand van de cellen (TEER) induceert. Uit de resultaten van deze experimenten is gebleken dat korte keten inuline-type fructanen grotendeels beschermen tegen de schade die door PMA aan de barrière veroorzaakt wordt. In tegenstelling tot de korte ketens werd dit effect niet waargenomen na behandeling met lange keten inuline-type fructans. Deze resultaten bevestigen dat ketenlengte sterk bepalend is voor de uitkomst van deze barrière experimenten. De volgorde van incubatie bleek ook een essentiële factor in het beschermende vermogen, omdat geen stimulerende effecten op herstel werden waargenomen wanneer PMA werd toegediend vóór de stimulatie met inuline-type fructanen. Door TLR2 te blokkeren met behulp van een antilichaam werd het beschermende effect van korte keten inuline-type fructanen teniet

gedaan, wat bevestigt dat TLR2 betrokken is bij inuline-type fructan gemedieerde bescherming van de darmepitheel barrière. Naast activatie van TLR2 en inductie van cytokine productie in immuuncellen hebben inuline-type fructanen hier ook een beschermend effect op de barrière van humane T84 darm epitheel cellen die afhankelijk is van timing en ketenlengte en tevens gemedieerd is via TLR2.

Uit de 'proof of principle' experimenten kunnen we concluderen dat inuline-type fructanen directe activatie van immuuncellen veroorzaken en darmepitheel kunnen beschermen tegen schade. Het ontwikkelde technologieplatform uit deze studies werd vervolgens gebruikt om meerdere vezeltypen te bestuderen. Vanwege hernieuwde interesse in het gebruik van restproducten (pulp), die geproduceerd worden bij de extractie van inuline uit cichoreiwortel, voor gezondheidsbevorderende doeleinden, werden twee hoofdbestanddelen van deze pulp bestudeerd, namelijk cellulose en pectines. In **Hoofdstuk 4** worden de immuunmodulerende effecten van cellulose beschreven. TLR reporter assays bevestigden dat cellulose immuuncellen kan activeren middels TLR/MyD88- afhankelijke en onafhankelijke pathways. Het transcriptoom van PBMCs die gestimuleerd werden met cellulose werd onderzocht d.m.v. genchip array. Uit deze experimenten bleek dat drie NF- κ B gerelateerde genen opgereguleerd werden, nl. het cluster of differentiation 40 (CD40) molecuul, interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), en interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1). Vijf genen die specifiek betrokken zijn bij TLR signalering werden opgereguleerd, nl. interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), jun proto-oncogene, mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MAP2K3), en mitogen-activated protein kinase 13 (MAPK13). Bij bestudering van barrière effecten bleek cellulose geen bescherming te bieden tegen PMA-geïnduceerde schade aan T84 darmepitheelcellen. Aan de hand van deze experimenten kunnen we concluderen dat cellulose geen directe effecten heeft op de barrière functie van darmepitheel cellen, maar cellulose induceert wel veranderingen in genexpressie in humane immuuncellen en activeert TLR-afhankelijke en onafhankelijke pattern recognition pathways, wat veelbelovend is voor het gebruik van cellulose uit cichoreipulp voor verdere experimenten.

In **Hoofdstuk 5** behandelen we de immunogene en barrière beschermende effecten van een ander hoofdbestanddeel van

cichoreipulp, pectine. Bovendien werden de effecten van verschillende percentages van methyl esterificatie van pectines bestudeerd, om te onderzoeken of dit structurele kenmerk van pectines ook van invloed is op de effecten die deze vezels induceren. Vanwege het feit dat cichoreiwortel nog niet opgezuiverd commercieel verkrijgbaar is, en omdat het pectine profiel wat geëxtraheerd kan worden uit citroenen sterke gelijkenis vertoont met dat van cichoreiwortel werden voor dit doeleinde pectines uit citroen gebruikt als modelpectines.

Stimulatie van TLR reporter cellen met citroen pectines van verschillende graad van methyl esterificatie (30DM, 56DM en 74DM), liet een TLR-afhankelijke activatie zien, waarbij activatie toenam met toenemend gehalte aan methylgroepen. Deze pectines activeerden TLR2, en daarnaast vertoonde ook TLR4 een matige activatie. 30DM en 74DM pectines hadden daarnaast een sterke beschermende werking tegen PMA, terwijl 56DM slechts een gematigde bescherming van TEER liet zien in T84 cellen. Om te bestuderen of kleinere onderdelen van de pectines die in de darm kunnen ontstaan door vertering door bacteriën dezelfde of andere effecten hebben op TLR activatie werden de pectine polymeren enzymatisch behandeld wat leidde tot afbraak naar oligomeren. Deze oligomeren lieten echter geen enkele activatie van de TLRs meer zien. Samenvattend kunnen we uit deze experimenten concluderen dat activatie van immuuncellen DM afhankelijk is en via TLR2 verloopt, en mogelijk ook via TLR4, en dat de intacte polymeerstructuur essentieel is voor TLR activatie. Daarnaast is de graad van methyl esterificatie een bepalende factor voor de bescherming van de epitheel cel barrière.

Voortbouwend op de resultaten die verkregen zijn in de in vitro experimenten met inuline-type fructanen, hebben we de hypothese opgesteld dat lange keten verrijkte inuline-type fructanen het immuunsysteem in vivo kunnen stimuleren, vanwege het overwegend pro-inflammatoire cytokine profiel dat geïnduceerd werd, inclusief een relatief lage IL-10/IL-12 ratio, gecombineerd met een sterk vermogen om TLR2 te activeren. In **Hoofdstuk 6** worden de resultaten beschreven van een humane studie naar hepatitis B vaccinatie effectiviteit in jongvolwassenen die rondom vaccinatie gesupplementeerd werden met verschillende inuline-type fructans. De effecten van lange keten fructan supplementen op de anti-HBsAg titer ontwikkeling in the 28 dagen na de eerste injectie van een hepatitis B vaccinatie werden vergeleken met de effecten van korte keten fructan supplementen en een placebogroep. Het

lange keten supplement liet op T35 een significante verhoging van de titer respons zien vergeleken met de respons van de korte keten groep. Daarnaast was er een sterke, verhoogde trend zichtbaar ten opzichte van de titer ontwikkeling in de placebo groep. Een treffende waarneming daarnaast was de identificatie van twee responders, d.w.z. proefpersonen met een titer boven 10 IU/mL plasma, in de lange keten groep terwijl in de korte keten groep en placebo groep geen responders werden gevonden. Flow cytometrie analyse van lymfocytenpopulaties in perifeer bloed van de geïncludeerde proefpersonen liet zien dat de toename in titer respons in de lange keten groep op T35 gecorreleerd was met een toename in percentage van TBET+ Thelper1 (Th1) cellen vergeleken met de basaalmonsters, en tevens ten opzichte van alle gemeten tijdstippen in de placebo groep. Ondanks een algemene toename in de tijd, was het percentage CD294+ Thelper2 (Th2) cellen op T35 het kleinst in de lange keten groep vergeleken met de korte keten en de placebo groep. Deze resultaten lijken erop te wijzen dat er een verschuiving in de Th1/Th2 balans heeft plaatsgevonden in de lange keten groep richting Th1 cel responsen. In het B cel compartiment, was het relatieve aandeel van IgG⁺ cellen binnen de class-switched (IgD⁻) B cel populatie op tijdstip T21 verhoogd in de lange keten groep. Bovendien was het percentage van IgM⁺ cellen in de non-class switched memory B cel populatie op T35 significant verlaagd in deze groep vergeleken met de basaalmonsters. Daarnaast was ook het percentage transitionele B cellen (in het proces van maturatie, CD38^{hi} IgM^{hi}) significant verhoogd in de lange keten groep en de placebo groep op T14 en T21 vergeleken met de basaalmonsters maar dit was niet het geval in de korte keten groep. NK en NKT cellen lieten geen duidelijke supplement afhankelijke verschillen zien, wat erop duidt dat specifiek de B-, en T cellen betrokken zijn bij het boosten van de vaccinatie respons d.m.v. inuline supplementen. Deze studie bevestigt de in vivo immuun stimulerende functie van lange keten inuline-type fructanen en onderbouwt daarmee een belangrijke gezondheidsclaim.

De bevindingen in dit proefschrift worden tot slot bediscussieerd in **Hoofdstuk 7**.

