

University of Groningen

The role of disease risk and life history in the immune function of larks in different environments

Horrocks, Nicholas Piers Christopher

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:
2012

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

Citation for published version (APA):

Horrocks, N. P. C. (2012). *The role of disease risk and life history in the immune function of larks in different environments*. s.n.

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 (Dutch summary)

Dit proefschrift onderzoekt de rol van ziekterisico en ontwikkelingsgeschiedenis op de vorming van de immuunfunctie van leeuweriken (*Alaudidae*) in verschillende omgevingen. Daartoe heb ik data verzameld van vogels die leven in de bergen van Afghanistan, in de woestijnen van Saoedi-Arabië, in de graslanden in Kenya en in een nationaal park in Nederland. In al deze verschillende omgevingen moeten de vogels de universele uitdagingen die zijn geassocieerd met overleven en voortplanting aangaan. Verschillende soorten hebben verschillende manieren ontwikkeld - dat wil zeggen verschillende ontwikkelingsgeschiedenissen - om dit te bereiken. Een essentieel onderdeel van zelfbehoud en overleving is de verdediging tegen de diverse en meedogenloze bedreigingen van infectie en ziekte, waar alle soorten continu aan worden blootgesteld. Speciaal voor dit doel heeft het immuunsysteem zich ontwikkeld. De vorm en functie van het immuunsysteem verschillen binnen en tussen de verschillende soorten, wat het gevolg kan zijn van verschillende ontwikkelingsgeschiedenissen of van de ziekte-omgevingen waarin de verschillende soorten zich bevinden. Een belangrijk doel van dit proefschrift is te onderzoeken op welke manier deze twee mogelijkheden bijdragen aan de immunologische variatie.

Ecologische Immunologie

Alle dieren bezitten een bepaalde vorm van een immuunsysteem. Dit is de groep van anatomische, chemische en fysiologische verdedigingsmechanismen die samen een dier beschermen tegen vreemde organismen en stoffen, inclusief zijn eigen abnormale cellen, die potentieel gevaarlijk zijn voor het dier. Dit zeer complexe en uit meerdere niveaus bestaande systeem is van essentieel belang voor het leven en brengt veel voordelen, waaronder het minimaliseren van de negatieve invloeden van infecties en ziekte op een organisme. Immuunsystemen zijn echter kostbaar wat betreft de energie en tijd die nodig zijn om ze te ontwikkelen, te onderhouden en te gebruiken en vanwege de 'collateral damage' die sommige immunologische reacties hebben op de lichaamseigen gezonde cellen. Dit betekent dat een maximale immuunreactie niet noodzakelijkerwijs de meest optimale reactie is. Afhankelijk van de mate van beschikbaarheid van bronnen en de ziektedreiging kunnen dieren op een verschillende manier reageren wat betreft het type en de omvang van de immuunreactie. Het begrijpen en verklaren van dit type immunologische variatie binnen en tussen soorten zijn centrale doelstellingen van de ecologische immunologie, een wetenschap die gebruik maakt van immunologische metingen om ecologische en evolutionaire hypothesen te toetsen. Studies in de ecologische immunologie worden doorgaans uitgevoerd op niet-gedomesticeerde dieren, die vaak in het wild leven, en niet op de gebruikelijke proefdieren die worden gehouden in gecontroleerde laboratoriumcondities. Het doel is het begrijpen van de oorzaken van de immunologische variatie en niet zozeer de specifieke moleculaire mechanismen.

Een kosten en baten analyse

Vanaf het begin heeft de ecologische immunologie gebruik gemaakt van een kosten-baten kader als een krachtig middel om te verklaren waarom en op welke manier immuunsystemen zouden moeten variëren. Een van de benaderingen, gezien vanuit een kostenperspectief, erkent dat immuunsystemen kostbaar zijn, omdat ze bronnen (energie en tijd) vereisen voor hun ontwikkeling, onderhoud en gebruik. Omdat de bronnen beperkt zijn, gaat de investering in het immuunsysteem ten koste van andere fysiologische processen zoals groei en voortplanting, en vice versa. De 'ontwikkelingsgeschiedenis' van een soort beschrijft de combinatie van deze processen, die wordt gevormd door natuurlijke selectie om de hoeveelheid overlevend nageslacht te maximaliseren (dat wil zeggen om de vitaliteit te maximaliseren). Omdat het een eigenschap is die bijdraagt aan zelfbehoud, en daarmee aan overleving en mogelijkheden voor toekomstige voortplanting, verwacht men dat de immunofunctie zich naast andere voor de ontwikkelingsgeschiedenis kenmerkende eigenschappen heeft ontwikkeld met als doel de vitaliteit te maximaliseren. Dus sommige soorten hebben de investering in het immuunsysteem ondergeschikt gemaakt aan voortplanting, daarbij zelfbehoud en overleving opofferend ten gunste van het produceren van nageslacht op dat moment. Andere soorten investeren meer in zelfbehoud, langer leven en daarmee toekomstige mogelijkheden voor voortplanting, maar produceren minder nageslacht per voortplantingsmoment. Immunologen die zich bezighouden met de ecologie interpreteren de afwegingen aangaande zelfbehoud als een verklaring voor de variatie in immunoreacties die wordt gevonden tussen dieren. Hoewel deze benadering in het verklaren van immunologische variatie vruchtbaar is gebleken, zijn de conclusies mogelijk niet compleet. Immers, veel studies in de ecologische immunologie onderschatten de voordelen die immunoreacties met zich meebrengen.

Een tweede benadering in het leren begrijpen van de immunologische variatie beschouwt de voordelen van het immuunsysteem. Het voornaamste voordeel is uiteraard de verdediging tegen infectie met vitaliteitverminderende vreemde organismen, zoals parasieten en pathogenen (ziekte veroorzakende stoffen). Gezien de kosten die geassocieerd zijn met het immuunsysteem, wordt gedacht dat verdedigingsmechanismen groter of sterker zijn wanneer het infectierisico groter is. Voorbeelden van hoogrisico omgevingen zijn de tropen en zoetwater, omgevingen waarvan in sommige studies gesuggereerd wordt dat de blootstelling aan potentieel ziekteveroorzakende parasieten en pathogenen er zeer hoog is. Een hoge mate van socialiteit, grote groepen of agressieve interacties tussen individuen zijn voorbeelden van gedrag dat het risico op transmissie en infectie kan vergroten. Ondanks deze voorbeelden is het vinden van adequate metingen voor het beoordelen van het ziekerisico dat een individu treft niet vanzelfsprekend. Verschillende soorten kunnen bijvoorbeeld verschillende typen ziekerisico's en

verschillende mate van blootstelling treffen, en metingen die toepasbaar zijn in de ene omgeving zijn mogelijk niet geschikt in een andere omgeving. Onderzoekers hebben in plaats daarvan vaak niveaus van de immunologische verdediging gekwantificeerd en deze gebruikt als rechtvaardiging voor eerdere veronderstellingen over de manier waarop ziekterisico kan variëren. Als een alternatief worden de overvloed en diversiteit van parasieten op een gastheer gebruikt als aanduidingen van ziekterisico. Deze metingen worden waarschijnlijk al beïnvloed door de huidige immunoreacties van de gastheer, zowel door gedrag (zoals verzorging en de vermindering van parasieten) als op immunologische wijze. In hoofdstuk 2, brengen mijn co-auteurs en ik deze onderwerpen onder de aandacht. We creëren een kader waarin immunofunctie en selectieve druk door pathogenen kunnen worden beschouwd en belichten op welke manier een beter begrip van de bedreigingen door infecties kan helpen om variatie in immunologische verdedigingsmechanismen in perspectief te zetten. We introduceren het concept van het 'immunobiome' - alle levende organismen die leven in of op een gastheer en de mogelijkheid hebben zich te ontwikkelen in reactie op immunologische verdedigingsmechanismen. De interacties tussen het immuunsysteem en het specifieke immunobiome van een dier vormen zijn immunologische verdedigingsmechanismen, zowel op evolutionaire als ecologische tijdschalen. We pakken ook het praktische probleem aan van het meten van pathogenen en verruimen van ziekterisico in verschillende omgevingen, door moleculaire en andere methodes voor te stellen die geschikt kunnen zijn voor het gebruik in studies in de ecologische immunologie.

Een vergelijkend onderzoek met gebruik van leeuweriken

In de ecologie en ecologische immunologie wordt vaak gebruik gemaakt van vogels omdat ze over het algemeen goed zijn te observeren en te vangen en meestal in voldoende aantallen voorkomen zodat grote groepen kunnen worden bestudeerd. Individuele vogels kunnen op een niet-invasieve manier worden gemarkeerd met gekleurde ringen en variabelen in de levensgeschiedenis zoals legselgrootte kunnen relatief gemakkelijk worden gemeten. In hoofdstuk 3 treffen we voor het eerst de leeuweriken (Alaudidae), de familie van vogels die in dit proefschrift als proefstelsel wordt gebruikt. De keuze voor leeuweriken als studie-object is op het eerste gezicht wellicht een ongebruikelijke keuze. Deze zangvogels laten zich relatief moeilijk ontdekken en verstoppen hun nesten op of dichtbij de grond. Deze eigenschappen zouden leeuweriken minder geschikt maken voor experimentele handelingen dan bijvoorbeeld soorten die gebruik maken van nestkastjes. Toch bieden leeuweriken een ideaal studiesysteem voor het vergelijkend onderzoek dat ik heb uitgevoerd voor dit proefschrift. De benadering die gebruik maakt van een vergelijkend onderzoek is het sterkst wanneer

aan elkaar gerelateerde soorten worden vergeleken, waarbij complicerende factoren die ontstaan vanuit verschillende evolutionaire geschiedenissen worden vermeden. Alle leeuwerikensoorten eten vergelijkbaar voedsel en gedragen zich op een vergelijkbare manier, waardoor vergelijkingen tussen soorten niet worden beïnvloed door dieet of gedrag. Ondanks deze overeenkomsten en de universele voorkeur van leeuweriken voor een open grasland omgeving, ervaren verschillende soorten een breed scala aan klimaats- en omgevingsinvloeden, variërend van extreem droog tot vochtig en tropisch. Het gedrag, de fysiologie en de levensgeschiedenis van verscheidene leeuwerikensoorten levend onder deze verschillende omstandigheden zijn reeds uitgebreid bestudeerd. Het immuunsysteem binnen en tussen leeuwerikensoorten is echter nog nauwelijks gekarakteriseerd. Omdat wordt gedacht dat de verschillende klimaats- en omgevingsomstandigheden die de leeuweriken treffen een weerspiegeling geven van de verschillen in ziekterisico (dat wil zeggen een extreem droog leefgebied, laag ziekterisico; een vochtig en tropisch leefgebied, hoger ziekterisico), bieden leeuweriken een waardevolle methode voor het bestuderen van de ecologie en de evolutie van de immuniteit. De leeuweriken familie biedt een waardevol studiesysteem waarin gedrags- en fysiologische aspecten goed duidelijk zijn, waarin ontwikkelingsgeschiedenissen en omgevingsgerelateerde ziekterisico's tussen soorten variëren en waarin het begrip van de oorzaken en gevolgen van de variatie in het immuunsysteem een volgende stap vormt.

Immunologische verdediging in verschillende gradaties van voorspeld ziekterisico

Ik maak gebruik van leeuwerikensoorten om een vraag te beantwoorden die centraal staat in zowel mijn proefschrift als in de ecologische immunologie: in welke mate beïnvloeden omgevingsgerelateerd ziekterisico en ontwikkelingsgeschiedenis de investering in immuniteit en liggen ze ten grondslag aan de vastgestelde patronen in immunologische variatie? Zowel ziekterisico als levensgeschiedenis zijn eerder gebruikt in het verklaren van variatie in immuunreacties binnen en tussen soorten. Deze twee factoren vertonen echter co-variantie, wat het moeilijk maakt om vast te stellen welke factor meer geassocieerd is met de variatie in immuniteit. Bovendien kunnen voorspellingen over de investering in immuniteit op basis van deze factoren in sommige omstandigheden uiteenlopen (hoofdstuk 2). In hoofdstuk 3 relateer ik meerdere immunologische indices, gemeten in 23 populaties van 12 soorten leeuweriken, aan indicatoren van omgevingsgerelateerd ziekterisico en indices van ontwikkelingsgeschiedenis. In tegenstelling tot sommige vergelijkende studiesystemen waarin het voorspelde ziekterisico en ontwikkelingsgeschiedenis positief gecorreleerd zijn, variëren deze potentieel voorspellende variabelen onafhankelijk van elkaar tussen populaties leeuweriken.

Door deze onafhankelijkheid is er de mogelijkheid om hun relatieve rol in de vorming van de immunologische variatie te ontrafelen. Ik heb gevonden dat indices van de aangeboren immuniteit sterk positief correleren met abiotische indicatoren van omgevingsgerelateerd ziekterisico. Ontwikkelingsfactoren gerelateerd aan voortplanting vertonen daarentegen weinig relatie met de investering in de aangeboren immuniteit.

Ik heb de gradaties in ziekterisico weer gebruikt in hoofdstuk 4, waar ik samen met mijn mede-auteurs de variatie in immunologische verdedigingsmechanismen onderzoek, gebruikmakend van vergelijkbare analytische technieken, maar vanuit een iets ander perspectief bekeken. Ik heb de patronen van de antimicrobiotische eiwitten ovotransferrine en lysozym in het eiwit van de eieren van leeuweriken die zijn verzameld onderzocht in verschillende gradaties in ziekterisico. Eieren bieden een gesimplificeerd model van het immuunsysteem, gekarakteriseerd door minder verdedigingscomponenten en minder infectierisico's. Bovendien helpt het vergelijken en tegenover elkaar stellen van de relaties tussen ziekterisico en immunologische verdedigingsmechanismen in vogels en hun eieren in het identificeren van de selectiedruk die elk type verdedigingsmechanisme heeft gevormd. Afname van de vitaliteit van de eieren, de microbiologische belasting op de eierschaal en infectie van eieren door de eierschaal heen komen meer voor in vochtiger milieus. Dit bracht ons tot de voorspelling dat wanneer de antimicrobiologische verdedigingsmechanismen van eieren zich ontwikkelen om zich aan te passen aan het risico op microbiologische infectie, de concentraties van antimicrobiologische eiwitten in de eieren zouden moeten variëren op basis van milieuomstandigheden. In dat geval zouden eieren uit vochtige gebieden hogere concentraties ovotransferrine en lysozym moeten bevatten dan eieren uit drogere milieus. De resultaten van hoofdstuk 4 laten zien dat de concentraties ovotransferrine overeenkomen met onze voorspelling maar dat de concentraties lysozym tegenovergestelde patronen vertonen en het hoogst waren in droge milieus met een laag ziekterisico. Dit roept interessante vragen op over de functie van lysozym in vogeleieren en suggereert dat er mogelijk een uitwisseling bestaat tussen antimicrobiotische eiwitten in het eiwit. Uit de studie kwam ook naar voren dat neerslag, een onderdeel van het milieugebonden ziekterisico, de patronen van antimicrobiologische variatie niet goed kon verklaren, ondanks experimentele aanwijzingen dat vochtigheid van belang is voor het optreden van infectie door de eierschaal heen. Temperatuur was een betere voorspellende factor dan neerslag voor de concentraties van antimicrobiologische eiwitten in de eieren, maar temperatuur was geen goede voorspellende factor voor de immunologische verdedigingsmechanismen van leeuweriken in verschillende gradaties van ziekterisico (hoofdstuk 3). Deze tegenstrijdige invloed van temperatuur weerspiegelt wellicht de ectothermische aard van eieren en de endothermische eigenschappen van vogels.

Milieu- en seizoensvariatie in immunologische verdedigingsmechanismen en ziekerisico

Beide hoofdstukken 3 en 4 belichten de waarde van abiotische indicatoren voor de biotische variatie in ziekerisico. Toch ga ik in deel III van dit proefschrift verder met de conclusie van hoofdstuk 2, dat biotische metingen van componenten van het ziekerisico essentieel zijn voor het verder begrijpen van de waargenomen patronen in immunologische variatie. Ik introduceer een nieuwe techniek met luchtmonsters om de uitgebreidheid van microben die zijn afgescheiden van vogels en in de omringende lucht te kwantificeren. Deze methodes bieden zowel gastheerafhankelijke als gastheeronafhankelijke metingen van het biotisch ziekerisico. De ont koppeling van de verdedigingsmechanismen van de gastheer en de mogelijke blootstelling van de gastheer vertegenwoordigt een belangrijke vooruitgang in de ecologische immunologie en biedt een nieuwe ingang voor toekomstige studies. We hebben de methode met luchtmonsters gebruikt om de milieu- en vogelgerelateerde microbiologische verzamelingen te beoordelen van leeuweriken die leven in de Arabische Woestijn en het gematigde Nederland. We hebben ook de indices van de aangeboren immuniteit gemeten en deze beoordeeld in het licht van voorspellingen die zijn ontstaan vanuit het ziekerisico en de ontwikkelingsgeschiedenis, factoren die al eerder goed onderzocht zijn. Milieugebonden ziekerisico was beter in staat de variatie in immunologische verdedigingsmechanismen te verklaren dan de ontwikkelingsgeschiedenis, een vinding die de resultaten van hoofdstuk 3 onderbouwt. Leeuweriken in een gematigd milieu, die werden blootgesteld aan hogere concentraties microben in de lucht en dichtere microbiologische verzamelingen met zich meedroegen, vertoonden ook sterkere immunologische indices dan hun gelijken die in de woestijn leven. De verklaring van de immunologische variatie op basis van de ontwikkelingsgeschiedenis, die voorspelt dat leeuweriken die leven in de woestijn meer investeren in het immuunsysteem, werd daarentegen niet onderbouwd.

Tussen milieus wordt variatie gezien in ziekerisico's (hoofdstuk 5), maar variatie in ziekerisico binnen een milieu kan ook een belangrijke onderliggende factor zijn in de immunologische variatie. In hoofdstuk 6 beschrijf ik dat immunologische indices seizoensgewijs veranderen in leeuweriken die leven in de Arabische Woestijn. Ik laat ook zien dat deze veranderingen gepaard gaan met parallele aanpassingen in de microbiologische dichtheden die worden afgescheiden door vogels en met tegengestelde aanpassingen in de microbiologische concentraties in het wijdere milieu. Deze studie onderstreept de noodzaak van zowel gastheerafhankelijke als gastheeronafhankelijke indices wanneer men het ziekerisico kwantificeert en de resultaten roepen interessante vragen op over het omgevingsniveau waarop dieren immunologisch reageren op microben.

Een bijdrage aan de immunologische hulpmiddelen van de ecooloog

Ondanks het feit dat er de laatste vijftien jaar aanzienlijke vooruitgang is geboekt, blijft de wens van immunologen in de ecologie om niet-gedomesticeerde, in het wild levende soorten te bestuderen ook hun Achilleshiel. Reagentia voor niet-proefdieren zijn over het algemeen niet verkrijgbaar en protocollen die geschikt zijn voor dieren die worden gehouden in laboratoria kunnen ongeschikt zijn voor wilde dieren. In het laatste deel van dit proefschrift lever ik een bijdrage aan de immunologische hulpmiddelen van de ecooloog door het valideren van een voor veldwerk geschikte proefopzet voor het meten van ovotransferrine (hoofdstuk 7). Ovotransferrine is een acute fase eiwit waarvan de waarde in het bloed toeneemt in reactie op ontsteking en infectie. Hetzelfde antimicrobiotische eiwit wordt ook gevonden in het eiwit van vogeleieren, zoals we hebben beschreven in hoofdstuk 4.

Conclusie

In leeuweriken wordt de variatie in investering in aangeboren immunologische verdedigingsmechanismen verklaard door het ziekterisico en niet zozeer door de ontwikkelingsgeschiedenis (hoofdstukken 3 en 5). Dit resultaat biedt een tegenpool voor eerdere theoretische en empirische studies die de nadruk leggen op het belang van de ontwikkelingsgeschiedenis in het verklaren van immunologische variatie. Dit nieuwe inzicht is, deels, het resultaat van de ontwikkeling en toepassing van een methode voor het meten van gastheerafhankelijke en gastheeronafhankelijke factoren van ziekterisico (hoofdstukken 5 en 6). Deze methodes met directe metingen brachten verschillen in ziekterisico tussen individuen en tussen populaties aan het licht en hielpen in het valideren van abiotische indicatoren om te gebruiken wanneer directe metingen onmogelijk zijn. De methodes met directe metingen gaven ook inzichten in en riepen vragen op over de schaal waarop leeuweriken bedreigingen ondervinden en immunologisch reageren: de gegevens in dit proefschrift suggereren dat dit op vrij kleine schaal plaatsvindt (hoofdstuk 6). Er werd vertrouwd op abiotische indicatoren voor milieugebonden ziekterisico bij het beoordelen van de relatieve invloed van ziekterisico en ontwikkelingsgeschiedenis op de immunologische variatie (hoofdstukken 3 en 4). Hoewel deze abiotische indicatoren nuttig, goed gevalideerd, logistiek ongecompliceerd en gemakkelijk te begrijpen zijn, is verdere toepassing van methodes met directe metingen veelbelovend voor de vorming van ons begrip van de interacties tussen ziekterisico en de investering in immuniteit. Het zijn specifiek de moleculaire technieken die de potentie hebben de directe meting van pathogenen en andere immuunreactieve stoffen drastisch te wijzigen (hoofdstuk 2), met name wanneer hun toepassing gemakkelijker en praktischer wordt in de verscheidenheid aan

omstandigheden in het veldwerk. In dezelfde geest zullen nieuwe proefopzettingen voor het meten van additionele aspecten van de immuniteit (hoofdstuk 7) een completere karakterisering van het immuunsysteem mogelijk maken. Vanaf het begin heeft men in het veld van de ecologische immunologie uitdagende vragen opgeworpen en geprobeerd te beantwoorden over hoe en waarom het immuunsysteem zo variabel is in zijn structuur en zijn reacties. Ik hoop dat mijn proefschrift bijdraagt aan dit voortschrijdende proces door het beantwoorden van sommige en het opwerpen van veel meer vragen.