

# VU Research Portal

## **Bacterial interactions in the female genital tract**

Singer, M.

2019

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Singer, M. (2019). *Bacterial interactions in the female genital tract: A triangle affair between pathogens, microbiota, and host.*

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## SAMENVATTING

Dit proefschrift bestudeert en beschrijft de interacties tussen pathogenen, microbiota, en de gastheer zoals ze voorkomen in de vrouwelijke genitale kanaal. Daarnaast wordt gekeken naar de effecten die deze interacties hebben op de risico's voor de gastheer om beïnvloed te worden door infecties, ziekte, en vruchtbaarheidsproblemen. In **deel 1** van de thesis wordt specifiek aandacht besteed aan de interacties tussen binnendringende pathogenen en het immuunsysteem van de gastheer, terwijl in **deel 2** de relaties tussen de vaginale microbiota, potentiële pathogenen, en de reproductieve gezondheid van de gastheer verder worden onderzocht.

Er is vaak een grote discrepantie tussen patiënten in de klinische presentatie van dezelfde infectie in het vaginale kanaal. Deze discrepantie is het meest merkbaar tussen symptomatische en asymptomatische patiënten. Hoewel er veel potentiële redenen zijn voor de verschillende klinische presentaties van deze ziekten (bijv. voeding, lichamelijke gezondheid, roken, de samenstelling van de vaginale microbiota), richten we ons in **deel 1** op de immuunrespons zoals deze door de gastheer wordt geproduceerd tegen pathogenen. Dit wordt gedaan door het bestuderen van potentiële factoren die van invloed kunnen zijn op het vermogen van de gastheer om effectief te reageren op de binnenvallende ziekteverwekker, zoals de genetische aanleg van de gastheer. De genetische samenstelling van de gastheer weerspiegelt echter mogelijk niet altijd het potentieel van de gastheer om te vechten tegen een infectie. Daarom kijken we ook naar de variatie in expressie van cytokines na infectie zoals die zich voordoet tussen patiënten. De niveaus van tot expressie gebrachte cytokinen geven een beter beeld van dit potentieel en hoe dit de klinische presentatie van de meest voorkomende bacteriële seksueel overdraagbare aandoeningen (SOA) beïnvloedt.

De vaginale microbiota is een integraal onderdeel van de gezondheid van het vrouwelijke genitale kanaal. De immunologische functie van de vaginale microbiota is duidelijk gedefinieerd als een effectieve mechanische barrière die opportunistische pathogenen afweert. De studie van complexe interacties tussen de microbiota en externe factoren heeft echter meerdere andere rollen voor de vaginale microbiota in de gezondheid van de gastheer verduidelijkt. **Deel 2** van dit proefschrift beschrijft eerst de huidige kennis van deze complexe interacties tussen de microbiota en *Chlamydia trachomatis* en *Mycoplasma genitalium*. Daarnaast wordt de omvang van het effect van de vaginale microbiota op in-vitrofertilisatie (IVF) tijdens verschillende stadia van de zwangerschap beschreven. Vervolgens beschrijft

het de samenstelling van vaginale microbiota van subfertiele vrouwen. Ten slotte wordt, om de mate van anatomische dekking van de vaginale microbiota te verduidelijken, een vergelijking gemaakt tussen deze vaginale microbiota-samenstellingen en microbiota gevonden na het nemen van monsters van urine van dezelfde persoon.

### **Deel 1: Pathogenen in het vaginale kanaal en de interactie met het immuunsysteem**

Analyse van de expressie van cytokines is de meest directe manier om de omvang van een immunrespons op een infectie te bestuderen. Gastheer specifieke verschillen in cytokine-expressie kunnen direct leiden tot verschillen in de progressie en klinische presentatie van bacteriële SOA's. Omgekeerd kunnen bacterie specifieke verschillen ook leiden tot een verhoogde cytokine-expressie in de gastheer. In **Hoofdstuk 1** voeren we meta-analyses van de beschikbare literatuur uit betreffende de expressie van cytokines tijdens infectie met *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, en *Treponema pallidum*. De resultaten van deze meta-analyses tonen aan dat stijgingen in interleukine (IL) -1, IL-6, IL-8, IL-10, tumornecrosefactor alfa (TNF $\alpha$ ) of interferon (IFN) - $\gamma$  significant de klinische uitkomst beïnvloeden van infecties met *C. trachomatis*. Al deze effecten, behalve die veroorzaakt door verhoogde IL-10-expressie, veroorzaakten ernstigere infecties met *C. trachomatis*. Interessant is dat een toename van *C. trachomatis* gerelateerde complicaties zoals tubaire pathologie en kleine bekken ontsteking (in de Nederlandse literatuur wordt hier vaak de Engelse term "Pelvic Inflammatory Disease" voor gebruikt) ook werd gevonden bij mensen die een verhoogde expressie van IFN- $\gamma$  en TNF $\alpha$  hadden. Een verhoogde expressie van IL-10 verminderde juist de ernst van de infectie, wat in overeenstemming is met de immunoregulerende functie van dit cytokine. Net als bij *C. trachomatis* toonden meerdere onderzoeken naar IL-1- en IL-8-expressie tijdens *N. gonorrhoeae* infectie geaggregeerde effecten die de ernst van de ziekte aanzienlijk verhogen. Helaas konden deze resultaten niet worden gekoppeld aan specifieke late complicaties van *N. gonorrhoeae* infecties. Tenslotte toonden voor *T. pallidum* infectie geaggregeerde onderzoeksgegevens dat IFN- $\gamma$  expressievariatie in gastheren kon worden gekoppeld aan een toename van de ernst van deze ziekte. De verhoogde expressie van dit cytokine versnelde ook nog eens de progressie van de ziekte naar neurosyphilis, wat een uiterst schadelijk en mogelijk dodelijk stadium van deze ziekte is. Een belangrijke beperking van het onderzoek gevonden in de meta-analyses was dat meerdere potentieel relevante cytokines niet konden worden opgenomen in een meta-analyse, omdat niet genoeg onderzoeken naar de beschreven infecties de expressieniveaus van deze cytokinen hebben bestudeerd.

Expressie van cytokinen gerelateerd aan ontsteking wordt voor een groot deel geïnitieerd via de NF- $\kappa$ B-route. Toll-like receptor (TLR) 9 is een van de pathogeen herkenningsreceptoren (PRR) die de NF- $\kappa$ B-route induceert na binding aan ongemethyleerd CpG DNA. In **Hoofdstuk 2** gebruiken we het eerder aangetoonde feit dat de hexamere configuratie van deze CpG DNA motieven een verhoogd of verlaagd stimulerend effect heeft op de activering van de NF- $\kappa$ B route doormiddel van TLR9 stimulatie. Met behulp van een *in silico* opstelling berekenen we de CpG-index van 11 bacteriesoorten die gebruikelijk in de vagina worden aangetroffen als pathogeen of als commensale bacterie. In het bijzonder vertoont *N. gonorrhoeae* een CpG-index van -79,5 en is het de enige opgenomen bacteriesoort die een remmend effect vertoont. *G. vaginalis* toonde de hoogste CpG-index met een waarde van 26,2. *Lactobacillus* soorten vertoonden een bijna neutrale CpG-indexwaarde van 4,2, die kan worden gekoppeld aan de commensale rol van deze bacterie soort in de vagina. Er kon echter geen verband worden gevonden tussen CpG-indexwaarden en pathogeniciteit of commensaliteit van de bacteriën.

Nadat in het vorige hoofdstuk de genetische samenstelling van bacterieel DNA is behandeld, word in **hoofdstuk 3** de genetische verschillen tussen gastheren besproken. Het kenmerkende symptoom van een infectie met *Haemophilus ducreyi* zijn pijnlijke genitale ulcera die bekend staan als zachte sjankers. Het risico van de ontwikkeling van deze ulcera verschilt echter per persoon, waarbij sommige geïnfecteerde gastheren compleet asymptomatisch blijven. Dit suggereert een genetische factor die effect heeft op de ernst van deze ziekte. In dit hoofdstuk zijn 105 vrijwilligers die in de VS leven experimenteel besmet op 3 plaatsen op de arm met *H. ducreyi*. Het aantal ontwikkelde ulcera is genomen als een maat voor de ernst van de ziekte. Single nucleotide polymorfisme (SNP) analyses op het DNA van de gastheer, gericht op 14 SNP's gerelateerd aan 7 PRR pathway gerelateerde genen, creëerden een verband tussen de ernst van de infectie en de genetica van de gastheer. Bij Europees-Amerikaanse vrijwilligers heeft de SNP *TLR9* +2848 GG een beschermend effect op de ernst van de ziekte en heeft het *TLR9* TA-haplotype van *TLR9* -1237 en *TLR9* +2848 een risico verhogend effect. De resultaten verschilden in Afrikaans-Amerikaanse vrijwilligers, waar een beschermend effect werd gevonden voor *IL10* -2849 AA, en een risico verhogend effect werd gevonden voor het *IL10* -2849 A, *IL10* -1082 A en *IL10*-819 C haplotype. Grotere studies naar het effect van gastheer genetische verschillen kunnen waarschijnlijk nog meer associaties ontdekken tijdens infectie met *H. ducreyi*, deels omdat een duidelijke link tussen gastheer immunogenetica en ernst van de infectie nu duidelijk is geworden.

## Deel 2: De interactie tussen de vaginale microbiota en de reproductieve gezondheid van de gastheer

De interacties tussen de vaginale microbiota en pathogenen zijn een cruciale eerste stap in de ontvankelijkheid van de gastheer voor een ziekte. De huidige kennis over deze interacties tussen de microbiota en pathogenen *C. trachomatis* en *M. genitalium* wordt beschreven en besproken in **hoofdstuk 4** van dit proefschrift. De rol van oestrogeen als een gastheerfactor met indirecte effecten op de microbiota en pathogene interacties is specifiek merkbaar. Andere punten van discussie zijn de effecten gerelateerd aan niveau verschillen van melkzuur en  $H_2O_2$  op *C. trachomatis* en *M. genitalium*. Van melkzuur is aangetoond dat het een competente remmer is van *C. trachomatis*, terwijl  $H_2O_2$  bacteriële vaginose (BV) gerelateerde bacteriën zoals *M. genitalium* remt. Over het algemeen is de aanwezigheid van een grote hoeveelheid *Lactobacillus spp.* in de vagina een indicator voor verminderde gevoeligheid voor allebei de bestudeerde pathogenen. Een belangrijk resultaat is de identificatie van de kloof in de huidige kennis met betrekking tot interacties tussen *M. genitalium* en de vaginale microbiota. *C. trachomatis* wordt uitgebreid bestudeerd, maar voor *M. genitalium* moesten we vaak de mechanismen gebruiken die in verband zijn gebracht met andere *Mycoplasma*-soorten om antwoorden te vinden. Bovendien moet vaak gespeculeerd worden over interacties van *M. genitalium* met het vaginale microbiom en de gastheer door te kijken naar functionaliteit van andere pathogenen, zoals *C. trachomatis* in het geval van dit hoofdstuk.

Als onderdeel van de invloed van de vaginale microbiota op de IVF-behandeling wordt het ontwikkelingsproces voor de vroege zwangerschap besproken in **hoofdstuk 5**. Vanwege de timing is het potentiële effect van de vaginale microbiota in dit vroege zwangerschapproces het meest duidelijk tijdens de conceptie. Een meta-analyse is uitgevoerd om zes studies te aggregeren, om vervolgens aan te tonen dat de aanwezigheid van abnormale vaginale microbiota, weergegeven als BV, 1.4 keer zoveel kans op IVF-falen in deze vroege zwangerschapsfase oplevert. Tijdens de systematische literatuurstudie is het echter duidelijk geworden dat methodologieën in onderzoeken naar de vaginale microbiota tijdens IVF-behandelingen vaak op belangrijke punten variëren. Microbiota-profielen worden bijvoorbeeld waarschijnlijk verschillend gedetecteerd tussen de onderzoeken als het vaginale monster tegelijkertijd met een antibioticabehandeling wordt ingenomen in vergelijking met geen antibiotica. Dit hoofdstuk suggereert een aantal methodologische factoren die specifieke aandacht verdienen van lezers en onderzoekers die geïnteresseerd zijn in het onderwerp microbiota tijdens IVF.

In **hoofdstuk 6** vragen we of de vaginale microbiota van een vrouw die een IVF-behandeling ondergaat een indicatie kan geven over de uitkomst van deze IVF-behandeling. Het huidige succespercentage van IVF-behandelingen ligt dicht bij 30% per behandeling, dus de uitkomst van dit onderzoek kan behandelingen helpen voorkomen die waarschijnlijk niet zullen slagen. Bovendien, als specifieke microbiota gerelateerd zijn aan het resultaat, kan modulatie een effectieve tactiek blijken te zijn om de kansen op succesvolle IVF-behandelingen te verbeteren. Voor de analyses werden vaginale en urinemonsters genomen van een groep van 297 vrouwen die een IVF-behandeling kregen, om vervolgens een microbiota-profilering uit te voeren. Onze resultaten toonden aan dat vrouwen met een lage hoeveelheid *Lactobacillus spp.* in hun vaginaal monster hadden minder kans op een succesvolle embryo-implantatie. Verrassend, en in tegenstelling tot de vorige verklaring, was een hoeveelheid van minder dan 60% van *L. crispatus* een voorspeller om zwanger te worden. Deze factoren en verschillende factoren met een kleinere impact werden verwerkt in een voorspellend algoritme genaamd de ReceptIVFity-test. Deze test toonde een voorspellende nauwkeurigheid van 94% (gevoeligheid 26%, specificiteit 97%) bij het voorspellen van een negatieve IVF-uitkomst. Deze bevinding maakt de weg vrij voor mogelijke interventies in de toekomst, maar die zouden verdere studies over dit onderwerp vereisen. Voorlopig kan deze test helpen door paren een beter geïnformeerde beslissing te laten nemen met betrekking tot de timing van hun IVF-behandelingscycli.

Een ander onderwerp dat recent een punt van discussie is geworden, is het bestaan van een urinaire microbiota. Hoewel de blaas van oudsher wordt beschouwd als een steriele ruimte, hebben meerdere studies besproken dat microbiota gedetecteerd door middel van urinemonstering nauw lijkt op de vaginale microbiota. In **hoofdstuk 7** wordt dit onderwerp verduidelijkt. Om deze duidelijkheid te krijgen hebben we de microbiota en IVF-behandelresultaten van de vrouwen in het vorige hoofdstuk gebruikt. De vaginale en urinaire microbiota die bij deze vrouw werden aangetroffen, hadden een opvallende gelijkenis. Opmerkelijke afwijkingen deden zich voor als een grote hoeveelheid *E. coli* in de urinemonsters van sommige vrouwen, zonder te verschijnen in de respectieve vaginale monsters. Deze zijn waarschijnlijk te wijten aan subklinische cystitis in de urinewegen van de vrouw. We concluderen hieruit, in combinatie met de relevante huidige literatuur, dat er geen duidelijke urinair microbiota is. De gevonden microbiota is zeer waarschijnlijk een verdunning van de vaginale microbiota, en zal soms optreden als een reservoir voor de vagina, welke ervoor zorgt dat urinemonsters worden vervuult.

### **Concluderende opmerkingen**

Dit proefschrift benadrukt de complexiteit van de interacties tussen pathogenen, microbiota, en de gastheer. De studies opgenomen in dit proefschrift werpen licht op de interacties en bewijzen de relevantie van deze interacties in de verschillende infectieuze en reproductieve processen. De bevindingen in dit proefschrift gerelateerd aan de interacties van pathogenen met de gastheer geven duidelijk inzicht in de pathogenese van het pathogeen. Maar misschien nog belangrijker, werpen ze licht op het biologische achtergrondmodel van de klinische presentatie in de bestudeerde SOA's. Dit is een onderwerp dat consequent in verband is gebracht met de aanwezigheid en ernst van latere complicaties in verband met deze infecties. Met de resultaten van dit proefschrift hopen we een basis te creëren welke gebruikt kan worden voor verder onderzoek naar deze onderwerpen, maar ook voor translationele inspanningen om deze kennis in klinische settings te laten werken.

Dit proefschrift laat echter ook zien dat er nog veel werk op ons wacht. In het geval van infectieuze processen wordt de impact van microbiota op pathogenen vaak alleen beschreven voor de best bestudeerde pathogenen. In het geval van reproductie lijkt de huidige kennis vrij uitgebreid, maar significante valkuilen in studiemethoden creëren een situatie waarin zelfs experts problemen zouden kunnen hebben om de informatie correct te interpreteren. Voor al deze tekortkomingen zijn de interacties echter ook onderwerpen waarin ontdekkingen in een razendsnel tempo gebeuren. De potentiële impact van de implementatie van vaginale microbiota diagnostiek in de gezondheidszorg, en met name bij kunstmatige voortplantingstechnieken, wordt al opgemerkt. Dit zelfs tot het punt waar volledige acceptatie van de concepten misschien al onvermijdelijk is. We bevelen instellingen aan die van plan zijn de vaginale microbiota-diagnostiek over te nemen om extra voorzichtig te zijn bij het onderzoeken van de literatuur, maar ook om te beseffen dat de voordelen potentieel groot zijn.