

SAMENVATTING & ALGEMENE CONCLUSIES

Dit onderzoeksproject heeft als doel bij te dragen tot de kennis van quorum sensing peptide (QSP) gemedieerde interacties tussen het microbioom en de gastheer. Meer specifiek werden de effecten van deze peptiden op de hersenen onderzocht. In **hoofdstuk 1** wordt de duidelijke link tussen het darm microbioom en de hersenen, en zijn effecten op het gedrag en hersenfuncties, besproken. Bijkomend worden concepten zoals 'het microbioom' en 'quorum sensing peptiden' uitgelegd. Peptiden zijn in staat om de bloed-hersenbarrière te passeren en verschillende effecten uit te oefenen op de hersenen. Voorbeelden van zowel peptiden met therapeutische als toxische eigenschappen op de hersenen werden besproken. Dit toont aan dat QSP de hersenen mogelijk kunnen beïnvloeden en optreden als mediators van de darm-hersenen.

In het **tweede hoofdstuk** wordt de ontwikkeling van een microbioom-ziekte associatie databank, genaamd: 'Disbiome', besproken. Deze databank bevat informatie over microbioom verschillen tussen een patiënt populatie en een (gezonde) controle populatie. Elke microbiële species (bacterie, virus, schimmel,...) die differentieel abundant zijn tussen de patiënt -en controle populatie in een bepaalde ziekte worden voorgesteld als 'experimenten' in de databank. Informatie over het onderzochte staaltype, de staal locatie, de gebruikte detectiemethode, methodologische details, de onderzochte populatie en de originele publicatie worden allemaal gelinkt aan dit experiment. Zowel de ziekten als de microbiële species zijn geclassificeerd volgens gestandaardiseerde systemen, respectievelijk de MedDRA en de NCBI/SILVA taxonomie. De kwaliteit van manuscripten die deze microbioom-gastheer associaties rapporteren wordt ook nagegaan via een vragenlijst. Elk van de zestien vragen evalueren verschillende aspecten van het manuscript. Gebaseerd op deze vragenlijst zien we dat de rapportering van sommige parameters wijzigt in het verloop van de tijd. Dit wijst erop dat het rapporteren en/of het design (vb. gebruik van andere detectiemethoden) van dit type onderzoek evolueert. Tot op heden bevat de databank meer dan 1000 publicaties en vormt het een belangrijke dataset voor verder onderzoek naar microbioom-gastheer associaties.

In **hoofdstuk drie** wordt een screening van 85 QSP uitgevoerd gebruik makende van high-throughput *in vitro* screening experimenten op verschillende types hersencellen. Hierbij werd gekeken naar verschillende biologische effecten zoals wijzigingen in morfologie, cytokine productie en cytotoxiciteit. Gebaseerd op deze experimenten werden 25 peptiden gevonden die effecten vertoonden op één of meerdere celtypes. Echter, de meerderheid van deze effecten waren vals positieven aangezien deze resultaten niet gerepliceerd konden worden in bevestigingsexperimenten. Twee peptiden vertoonden

veelbelovende resultaten voor verder onderzoek. PapRIV vertoonde een niet-significante inductie van zowel IL-6 als TNF α , twee pro-inflammatoire cytokines, na behandeling van BV-2 microglia cellen. Dit wijst erop dat dit peptide microgliale cellen kan activeren en mogelijk een causatieve rol speelt in neuro-inflammatie en psychiatrische -en neurodegeneratieve aandoeningen. Orf4 vertoonde inductie van differentiatie in SH-SY5Y neuroblastoom cellen, erop wijzend dat dit peptide mogelijks een protectieve rol heeft in de ontwikkeling van neuroblastoom. Gebaseerd op deze resultaten werd PapRIV gekozen voor verder onderzoek in dit onderzoeksproject aangezien het belang van neuro-inflammatie in quasi alle neurologische aandoeningen.

Het farmacokinetisch profiel van PapRIV wordt onderzocht in **hoofdstuk 4** gebruik makende van zowel *in vitro* als *in vivo* modellen. Het peptide passeert het *in vitro* Caco-2 model, een model voor de intestinale wand, met een P_{app} van $1,37 \times 0,21 \times 10^{-9}$ cm/s. Eénmaal in het bloed, bereikt het peptide de bloed-hersenbarrière waar het een zeer hoge herseninflux vertoont met een K_i van $6,95 \mu\text{L}/(\text{g} \times \text{min})$ en een hersen distributievolume van $35,70 \mu\text{L}/\text{g}$, zoals aangetoond met een *in vivo* muismodel. Er treedt een sterke metabolisatie van het peptide op in de circulatie en verschillende weefsels met een half-leven van 20, 25, 90, 285 -en 523 minuten in respectievelijk de nieren, serum, faeces, lever en hersenen terwijl in colon weefsel geen metabolisatie werd waargenomen. Deze data wijzen erop dat PapRIV, dat wordt geproduceerd in de darm, in staat is de gastro-intestinale wand en de bloed-hersenbarrière te doorkruisen en de hersenen te bereiken waar het zijn mogelijke microglia activerende effecten kan uitvoeren.

In **hoofdstuk 5** wordt de endogene aanwezigheid van PapRIV aangetoond in muis plasma. Het peptide werd aangetoond in 4 van 66 plasmastalen gebruik makende van een specifiek UHPLC-MS systeem. De gevonden concentraties varieerden van 1.7 tot 19.2 nM. De aanwezigheid van dit peptide kon bevestigd worden wanneer een MS systeem met een hogere resolutie werd gebruikt. De *in vivo* aanwezigheid van een QSP werd hier voor de eerste keer aangetoond. Gebaseerd op BLAST resultaten, concluderen we dat de peptide sequentie niet aanwezig is in zowel het muis als humane proteoom wat erop wijst dat het gedetecteerde peptide niet afkomstig is van proteolytische klieving van endogene eiwitten aanwezig in het bloed en dat het gedetecteerde peptide dus van bacterieel origine is.

De pro-inflammatoire eigenschappen van PapRIV op microglia cellen worden verder onderzocht in **hoofdstuk 6**. Behandeling van BV-2 microglia cellen bevestigde de activerende eigenschappen van dit QSP. Een significante toename van IL-6, TNF α en reactieve zuurstof species werden geobserveerd in deze cellen. Deze effecten waren ook geassocieerd met een toegenomen fractie ameboïde cellen, een merker voor microglia activatie. De geobserveerde effecten waren gemedieerd door een activatie van

de canonieke NF- κ B pathway. Een toename van NF- κ B nucleaire translocatie en een afname van I κ B α expressie werd waargenomen in de cellen. Kritieke aminozuren van het peptide werden aangetoond via een alanine-scan van het peptide. Wanneer zowel asparaginezuur als proline op posities 2 en 4 vervangen werden door een alanine, vertoonden de betreffende peptiden geen activiteit meer. Dit toont aan dat deze twee aminozuren essentieel zijn voor het peptide om zijn effecten uit te oefenen. PapRIV kan ook een indirecte rol spelen in neurodegeneratieve aandoeningen. Behandeling van SH-SY5Y neuroblastoom cellen met PapRIV geconditioneerd BV-2 medium, resulteerde in cytotoxiciteit van deze cellen terwijl directe behandeling van deze cellen met het peptide geen effecten vertoonde. DLPFEH, het belangrijkste metaboliet van PapRIV, behoudt microglia activerende eigenschappen. Via co-incubatie van het peptide met verschillende inhibitoren van membraan-geassocieerde receptoren poogden we de doelwit receptor van het peptide op de BV-2 cellen te identificeren. Gebaseerd op de resultaten konden we concluderen dat PapRIV niet inwerkt op de P2X1, P2X3, P2X4, LPA en mineralocorticoïd receptoren. Een duidelijke conclusie over NMDA, P2X7, glucocorticoïd en amyline receptoren kon niet genomen worden omdat inhibitie van deze receptoren resulteerde in IL-6 niveaus die lager zijn dan placebo behandelde cellen wat erop wijst dat activiteit van deze receptoren ook aanwezig is in placebo behandelde cellen. Het is mogelijk dat PapRIV inwerkt als een agonist op één van deze receptoren, maar we kunnen hier geen conclusies uit trekken.

De resultaten van PapRIV werden enkel aangetoond in BV-2 microglia cellen. Het peptide vertoont geen effecten in zowel muis als humane geïnduceerde pluripotente stamcellen die gedifferentieerd werden tot een microglia fenotype. Ook na directe intracraniale injectie van het peptide in de hersenen werden er geen effecten waargenomen.

Tenslotte worden de effecten van peptiden op epigenetische mechanismen besproken in **hoofdstuk 7**. Peptiden van verschillende oorsprong zoals voedsel (bv. lunasin), endogeen (bv. kleine cryptische peptiden), de omgeving (bv. acyldepsi-peptiden) en synthetisch ontwikkelde peptiden, moduleren verschillende epigenetische mechanismen. Peptide gemedieerde effecten zijn voornamelijk: inhibitie van histon (de)acetylatisie en (de)methylatisie en DNA methylatisie. Peptiden kunnen ook Dicer gemedieerde miRNA maturatisie beïnvloeden wat resulteert in een hogere of lagere expressie van bepaalde miRNA's. Deze effecten kunnen implicaties hebben op de verdere ontwikkeling van therapeutische peptiden. Tot op heden zijn meer dan 60 peptide-geneesmiddelen op de markt waarvan de epigenetische (neven)werkingen grotendeels ongekend zijn. De ontdekking van potentiële epigenetische effecten van deze producten kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelingen via drug repurposing. Ontdekking van mogelijke ongewenste epigenetische bijwerkingen (vb. maligne transformaties) kan de veiligheid van deze producten verhogen.

In het **laatste hoofdstuk** wordt de maatschappelijke relevantie van dit project besproken en enkele suggesties worden gemaakt over hoe dit werk kan dienen als basis voor verder onderzoek en de ontwikkeling van nieuwe toepassingen.