



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Innate, adaptive and regulatory immune responses in human schistosomiasis in Gabon

Łabuda, Ł.

Citation

Łabuda, Ł. (2014, November 11). *Innate, adaptive and regulatory immune responses in human schistosomiasis in Gabon*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29659>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29659>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29659> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Łabuda, Łucja

Title: Innate, adaptive and regulatory immune responses in human schistosomiasis in Gabon

Issue Date: 2014-11-11



English Summary
Nederlandse Samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications
Acknowledgements

English Summary

Parasitic infections have been a human companion for millennia and currently a quarter of the world's population are infected with helminth worms. The long co-existence of worms and humans has profoundly influenced the human immune response. A healthy immune response will have a fine balance between effector mechanism directed against invading pathogens and regulatory mechanisms which keep the effector mechanisms in check and protect the body from tissue damage and inflammation. As our immune system has evolved to function in pathogen-rich environments, recent improvements in healthcare and hygiene may contribute to increased incidence of allergy, autoimmune disorders, cardiovascular diseases and other inflammatory conditions observed in Westernized countries today. It has been proposed that the decrease in infectious diseases is directly related to the increase in these disorders due to insufficient education of the immune system and an underdeveloped regulatory response. Chronic helminth infections, including schistosomiasis, have been shown to induce regulatory mechanisms, and the protective effect of helminth infections is very likely due to the down-regulation of the immune response by the parasite to ensure its own survival, which extends to bystander antigens i.e. allergens or self-antigens. However, down-regulation of the immune response, while protective against innocuous challenges, may also adversely affect immune responses against other pathogens, the efficacy of drug treatments or vaccine responses.

The mechanisms and consequences of immunomodulation induced by helminth infections are therefore of tremendous interest, as a better understanding of these will contribute towards new possibilities for control of infection and pathology and therapeutic applications in the treatment or even prevention of hyper-inflammatory disorders.

The work presented in this thesis is an investigation of the immune responses induced by chronic schistosomiasis in Gabonese schoolchildren. By investigating concurrently various aspects of the immune response we are able to gain a more in-depth understanding of the dynamic changes brought about by infection.

In **Chapter 1**, the background and context of the research is described, the study population and the area are introduced and the study objectives are outlined.

In **Chapter 2**, we compare innate immune responses to several classes of pathogen recognition receptors (PRRs) between semi-urban and rural African schoolchildren and European schoolchildren using identical reagents and experimental protocols in order to assess whether innate responses are affected by environmental factors. We show that while differences in response to Toll-like receptors (TLRs) stimulation are present, no differences to C-type lectin receptors (CLRs) or nucleotide-binding oligomerisation domain-like receptors (NLRs) were detected. Possible explanations for the differences in cytokine production observed in response to TLR ligands including variations in TLR expression levels, differences in downstream signalling pathways or differential exposure to viruses, bacteria and parasites are discussed.

Chapter 3 addresses differences in innate or non-specific and adaptive or specific immune responses in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) between *S. haematobium*-infected schoolchildren and uninfected controls. We find that innate immune responses are pro-inflammatory and that adaptive immune responses are anti-inflammatory. Anti-inflammatory

responses play an important role in adaptive immune hypo-responsiveness, a hallmark of chronic schistosomiasis, and we show that immune hypo-responsiveness induced by *S. haematobium* infection does not extend to innate immune responses.

In **Chapter 4**, we compare whole blood immune responses of *S. haematobium*-infected children before and after treatment with praziquantel and in parallel include uninfected children as controls. We find that innate immune responses do not differ between infection groups. The difference in innate responses observed between Chapters 3 and 4 may be explained by differences in cell composition in whole blood (in Chapter 4) versus PBMC (in Chapter 3). With respect to adaptive immune responses, infected children recognized schistosomal antigens, whereas uninfected children did not. Moreover, we show that antigen-specific responses that are seen in infected children are significantly increased following removal of infection. We provide evidence that regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) which were higher in infected children, decreased following anti-schistosome treatment and this decrease is associated with an increase in adaptive immune responses. These results for the first time provide evidence for the association between schistosome infection, regulatory T cells and antigen-specific immune hypo-responsiveness in humans.

In **Chapter 5**, we further expand our analysis of regulatory T cells and investigate the role of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells on cell proliferation and cytokine production in response to antigens in PBMCs before and after praziquantel treatment. We use principal component analysis (PCA), a data reduction approach, to study cytokine responses globally. We show that schistosome infection is associated with increased frequencies of Treg cells, which decrease following treatment. The reduction in Treg frequencies was accompanied by an increase in cytokine responses following treatment. Treg depletion studies confirm the inhibitory nature of these cells as their depletion resulted in increased cytokine production both at pre-treatment and post-treatment. Proliferative responses for the most part were not as significantly affected as cytokine responses.

We next address the role of B cells in the course of schistosome infection. In **Chapter 6**, we show novel data that schistosomiasis induces regulatory B cell (Breg) cells which like regulatory T cells are negative regulators of immune responses. We show that Gabonese schoolchildren have an elevated population of CD1d^{hi} B cells and that these cells produce elevated levels of IL-10. Importantly, after anti-schistosome treatment the frequency of these cells is reduced to levels comparable to the uninfected children.

In **Chapter 7**, we show that in addition to altered frequencies of Bregs, the frequency of memory B cell (MBC) subsets is increased in infected schoolchildren. At the functional level, these cells, while more activated, have reduced proliferation and pro-inflammatory cytokine production. Treatment resulted for the most part in restoration of function. Results in this chapter show that *S. haematobium* infection leads to significant changes in the B cell compartment both at the phenotypic and functional level.

Finally, in **Chapter 8**, the findings of this thesis are summarized. The interaction between innate, adaptive and regulatory responses is discussed and in particular emphasis is placed on regulatory responses. As regulatory responses have been shown to be not only important in chronic infectious disease, but also in chronic inflammatory diseases, the knowledge gained

Addendum

here may be of substantial value to the health of those living with infection and those currently affected by inflammatory conditions.

&

Nederlandse Samenvatting

Mensen dragen al millennia lang parasieten met zich mee en momenteel is een kwart van de wereldbevolking geïnfecteerd met wormen. Aangezien mensen in de loop van de evolutie voortdurend bloot zijn gesteld aan een rijke microbiële omgeving, ligt het in de lijn der verwachting dat de relatie van mensen tot 'hun' wormen gezien kan worden als één met commensalen en het afweersysteem ook ontwikkeld is om optimaal te functioneren in de voortdurende aanwezigheid van deze commensalen. Een gezonde afweerreactie wordt gekenmerkt door een balans tussen ontstekingsreacties gericht tegen binnendringende ziekteverwekkers, genaamd pathogenen, en tolerantieprocessen die deze ontstekingsreacties in toom moeten houden wanneer de pathogenen opgeruimd zijn. Deze tolerantiemechanismen beschermen het lichaam tegen weefselschade veroorzaakt door de ontstekingsreacties. In de afgelopen decennia is de gezondheidszorg en hygiëne in de westerse wereld enorm verbeterd, maar tegelijkertijd nam het aantal gevallen van ontstekingsziekten zoals allergieën, auto-immuunziekten en hart- en vaatziekten enorm toe. Verondersteld wordt dat een direct verband bestaat tussen de toename in deze ontstekingsziekten en de afname in infectieziekten. Aangezien ons afweersysteem is geëvolueerd om te functioneren in een pathogeenrijke omgeving, vermoedt men dat door de afname van infectieziekten het afweersysteem, en dan met name de aanmaak van tolerantieprocessen, onvoldoende wordt getraind. Daarentegen komen deze typische westerse ontstekingsziekten nog weinig voor in ontwikkelingslanden, maar komen er nog wel veel parasitaire infecties voor. Het is aangetoond dat chronische worminfecties, waaronder schistosomiasis, tolerantieprocessen kunnen opwekken. Het beschermende effect van worminfecties wordt vermoedelijk veroorzaakt door onderdrukking van ontstekingsreacties, waarmee de parasiet zijn eigen overleving veilig stelt. Deze tolerantieprocessen zouden ook neveneffecten veroorzaken, zoals een verminderde ontstekingsreactie op onschuldige allergenen zoals huisstofmijt en graspollen en lichaamseigen stoffen. Hoewel deze tolerantieprocessen op een positieve manier beschermen tegen overbodige reacties op onschuldige stoffen, zouden ook ontstekingsreacties tegen andere pathogenen en de effectiviteit van medicijnen en vaccins op een nadelige manier beïnvloed kunnen worden.

Onderzoek naar de mechanismen en gevolgen van de opgewekte ontstekingsreacties veroorzaakt door worminfecties zijn van groot belang, aangezien een beter begrip ervan kan bijdragen aan nieuwe mogelijkheden om infecties en weefselschade te beheersen en om zo typische westerse ontstekingsziekten te behandelen of zelfs te voorkomen.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar afweerreacties tegen chronische schistosomiasis in Gabonese schoolkinderen. Door gelijktijdig verschillende aspecten van de afweerreacties te onderzoeken, zijn we in staat de dynamische veranderingen veroorzaakt door de infecties, beter te begrijpen.

In **hoofdstuk 1** wordt de achtergrond en context van het onderzoek beschreven, worden de studiepopulatie en het studiegebied geïntroduceerd en worden de studiedoelstellingen uiteengezet.

In **hoofdstuk 2** vergelijken we de aangeboren of specifieke afweerreacties in het bloed van semi-stedelijke en landelijke Afrikaanse schoolkinderen en Europese schoolkinderen door het

gebruik van identieke reagentia en experimentele protocollen. De stimulatie van verschillende soorten receptoren die pathogenen herkennen, zoals Toll-like-receptoren (TLR), C-type-lectine-receptoren (CLR) en nucleotide-bindende-oligomerisatie-domein-'like'-receptoren (NLR), werd onderzocht zodat kon worden vastgesteld of aangeboren afweerreacties beïnvloed werden door omgevingsfactoren. We tonen aan dat, hoewel er verschillen waren in reacties op stimulatie van TLR, er geen verschillen werden gedetecteerd bij CLR of NLR receptoren. In dit hoofdstuk worden mogelijke verklaringen besproken voor de verschillen in productie van cytokines (signaalstoffen) die zijn waargenomen in reactie op TLR stimulaties, waaronder mogelijke verschillen in de genexpressie van de TLR receptoren, verschillen in onderliggende signaleringsroutes of verschillende blootstelling aan virussen, bacteriën en parasieten.

Hoofdstuk 3 richt zich op verschillen in aangeboren (of aspecifieke) en verworven (of adaptieve) ontstekingsreacties in witte bloedcellen uit veneus bloed tussen *S. haematobium*-geïnfecteerde en ongeïnfecteerde schoolkinderen. We hebben gevonden dat aangeboren afweerreacties ontstekingsbevorderend werken en verworven reacties ontstekingsremmend. We tonen aan dat de ontstekingsremmende reacties, ofwel tolerantieprocessen, die een belangrijke rol spelen in immuunhyposensitiviteit van adaptieve of verworven afweerreacties bij chronische schistosomiasis, zich niet uitstrekken tot aangeboren afweerreacties.

In **hoofdstuk 4** vergelijken we afweerreacties in volbloedkweken van *S. haematobium*-geïnfecteerde kinderen voor en na behandeling met praziquantel en in parallel met ongeïnfecteerde kinderen als controles. We tonen aan dat aangeboren afweerreacties niet verschillen binnen de infectiegroepen. Het verschil in aangeboren afweerreacties tussen hoofdstuk 3 en 4 zou verklaard kunnen worden door verschillen in celsamenstelling in het bloed (in hoofdstuk 4) en in de geïsoleerde witte bloedcellen (in hoofdstuk 3). In het geval van de verworven afweerreacties herkenden de cellen van geïnfecteerde kinderen de moleculen van schistosoom-wormen, terwijl de cellen van niet-geïnfecteerde kinderen dat niet deden. Bovendien hebben we aangetoond dat de reacties gericht tegen wormmoleculen in geïnfecteerde kinderen significant waren toegenomen na behandeling van infectie. We vonden een hoger percentage van regulatoire T cellen (een groep van tolerantie-bevorderende witte bloedcellen, gekarakteriseerd door de expressie van markers CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), in geïnfecteerde kinderen, wat vervolgens weer afnam na een behandeling tegen schistosomiasis. Deze afname was geassocieerd met een toename in verworven afweerreacties. Deze resultaten bieden voor het eerst bewijs voor de associatie tussen schistosoma-infecties, regulatoire T cellen en worm-specifieke immuunhyposensitiviteit in mensen.

In **hoofdstuk 5** breiden we onze analyse van regulatoire T cellen verder uit en onderzoeken we de rol van CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatoire T cellen in celdeling en cytokineproductie in reactie op wormmoleculen in witte bloedcellen voor en na praziquantel behandeling. We gebruiken principale-componentenanalyse (PCA), een datareductie-benadering, om de verschillende cytokines in het algemeen te bestuderen. We hebben aangetoond dat schistosoom-infectie is geassocieerd met hogere frequenties regulatoire T cellen, die daalden na behandeling. De afname in regulatoire-T-cel-frequenties ging gepaard met een toename in cytokineproductie tijdens behandeling. Studies waarin de regulatoire T cellen werden verwijderd, bevestigden het remmende karakter van deze cellen, aangezien hun depletie een toename in cytokineproductie

veroorzaakte zowel voor als na behandeling. In de meeste gevallen was celdeling veel minder sterk beïnvloed in vergelijking met de productie van verschillende cytokines.

We hebben ons daarna gericht op de rol van B cellen in het verloop van schistosoom-infectie. In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat schistosomiasis leidt tot meer regulatoire B cellen (Breg), witte bloedcellen die net als regulatoire T cellen afweerreacties onderdrukken. We bewezen dat Gabonese schoolkinderen een verhoogd percentage CD1d^{hi} Breg cellen in het bloed hebben en dat deze cellen meer van het onderdrukkende cytokine IL-10 produceerden. Een belangrijke bevinding was dat de frequentie van deze cellen was verlaagd na een schistosoom-behandeling tot een vergelijkbaar niveau als gevonden in niet-geïnfecteerde kinderen.

In **hoofdstuk 7** laten we zien dat naast veranderde Breg-frequenties, de frequentie van geheugen-B-cellen is toegenomen in geïnfecteerde schoolkinderen. Hoewel deze cellen meer geactiveerd lijken, zijn de celdeling en de productie van ontstekingsbevorderende cytokines in deze cellen verminderd. De behandeling van de kinderen voor hun wormen resulteerde grotendeels in functieherstel van deze cellen. De resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat een infectie met *S. haematobium* leidt tot significante veranderingen in het B-cel-compartiment, zowel op fenotypisch als functioneel gebied.

Ten slotte worden in **hoofdstuk 8** de bevindingen van dit proefschrift samengevat. De interactie tussen aangeboren- en verworven afweerreacties en tolerantieprocessen worden besproken, waarbij de nadruk wordt gelegd op kenmerken van de tolerantieprocessen. Aangezien er is aangetoond dat tolerantieprocessen niet alleen belangrijk zijn voor chronische infectieziekten, maar ook voor chronische ontstekingsziekten, kan de kennis hier opgedaan van substantiële waarde zijn voor de gezondheid van diegenen die leiden aan infecties of aan ontstekingsziekten.



List of Publications

Meurs L, Mbow M, Boon N, Vereecken K, Amoah AS, **Labuda LA**, Dièye TN, Mboup S, Yazdanbakhsh M, Polman K. *Cytokine responses to Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium in relation to infection in a co-endemic focus in Northern Senegal*. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug 7;8(8):e3080.

Labuda LA*, de Jong SE*, Meurs L, Amoah AS, Mbow M, Ateba-Ngoa U, van der Ham AJ, Knulst AC, Yazdanbakhsh M, Adegnikaa AA. *Differences in innate cytokine responses between European and African children*. PLoS One. 2014 Apr 17;9(4):e95241.

van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhana A, Janssen Bonas M, Dijkman TR, **Labuda LA**, Schot R, Guigas B, Möller GM, Hiemstra PS, Yazdanbakhsh M, Smits HH. *CD24^{hi}CD27⁺ B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide*. Clin Exp Allergy. 2014 Apr;44(4):517-28.

Labuda LA, Ateba-Ngoa U, Feugap EN, Heeringa JJ, van der Vlugt LE, Pires RB, Mewono L, Kreamsner PG, van Zelm MC, Adegnikaa AA, Yazdanbakhsh M, Smits HH. *Alterations in peripheral blood B cell subsets and dynamics of B cell responses during human schistosomiasis*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2094.

&

Mbow M, Larkin BM, Meurs L, Wammes LJ, de Jong SE, **Labuda LA**, Camara M, Smits HH, Polman K, Dieye TN, Mboup S, Stadercker MJ, Yazdanbakhsh M. *T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis*. J Infect Dis. 2013 Jan 1;207(1):186-95

van der Vlugt LE, **Labuda LA**, Ozir-Fazalalikhana A, Lievers E, Gloudemans AK, Liu KY, Barr TA, Sparwasser T, Boon L, Ngoa UA, Feugap EN, Adegnikaa AA, Kreamsner PG, Gray D, Yazdanbakhsh M, Smits HH. *Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells*. PLoS One. 2012;7(2):e30883.

Labuda L*, Meurs L*, Amoah AS#, Mbow M#, Ngoa UA, Boakye DA, Mboup S, Dièye TN, Mountford AP, Turner JD, Kreamsner PG, Polman K, Yazdanbakhsh M, Adegnikaa AA. *Enhanced pro-inflammatory cytokine responses following Toll-like-receptor ligation in Schistosoma haematobium-infected schoolchildren from rural Gabon*. PLoS One. 2011;6(9):e24393.

Adegnikaa AA, Köhler C, Agnandji ST, Chai SK, **Labuda L**, Breitling LP, Schonkeren D, Weerdenburg E, Issifou S, Luty AJ, Kreamsner PG, Yazdanbakhsh M. *Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood*. J Infect Dis. 2008 Sep 15;198(6):928-36.

Acknowledgements

I would like to acknowledge with much appreciation all the wonderful and inspiring people over the years without whom this thesis would not have been possible - thank you all so very much!

Supervisors:

Ayola Akim Adegnika
Hermelijn Smits
Maria Yazdanbakhsh

SCHISTOINIR team:

Abena Amoah
Lynn Meurs
Moustapha Mbow

CERMEL Gabon:

Anne-Marie Nkoma
Bertrand Lell
Claude Nzima Moussambi
Eliane Ngoune Feugap
Evrard Moutembi
Ghyslain Mombo-Ngoma
Guy Gaspard Nzadi
Ferdinand Gnansounou
Jeannot F. Zinsou
Judith Kammer
Ludovic Mewono
Maxime Agnandji Selidji
Markus Gmeiner
Olivier Koumba
Paul-Valerie Mbadinga
Sadu Issifou
Ulrich Tedy Mabama
Ulysse Ateba Ngoa
Yvonne Schmiedel

Paranymphs:

Luciën van der Vlugt
Sanne de Jong

PARA colleagues:

Alwin van der Ham
Arifa Ozir-Fazalalikhhan
Anouk Gloudemans
Bart Everts
Benedicta Obeng
Bruno Guigas
Caroline Remmerswaal
Corrie Verbree
Dian Amaruddin
Dicky Tahapary
Eddy Wiria
Elias Asuming Brempong
Ellen Lievers
Eriyani Sartono
Firdaus Hamid
Franca Hartgers
Govert van Dam
Honorine Mbenkep Lima
Jacqueline Janse
Jantien Guldemon
Karin de Ruiten
Katja Obieglo
Kit Yeng Liu
Leonie Husaarts
Linda May
Linda Wammes
Maria Kaiser
Noemie García Tardón
Regina Pires
Ron Hokke
Simone Häberlein
Sunny Sapthu
William van der Puije
Yenny Djuardi
Yvonne Fillié Grijpma
Yvonne Kruize
& all the other PARA's.

PARA students:

Brechje de Gier
Churnalisa Doran
Mareen Datema
Rogier Achterberg

Tübingen University:

Carsten Koehler
Iris Pfitzer
Peter Kreamsner

ErasmusMC:

Jorn Heeringa
Menno van Zelm

Institute of Tropical

Medicine

in Antwerp

Katja Polman

Thesis Committee

**& all the study
participants.**

&