

# **Helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms**

Thesis by: **Elly van Riet**

Promotores:

**Prof. dr. M. Yazdanbakhsh**

**Prof. dr. A.G.M. Tielens**

Copromotor:

**Dr. F.C. Hartgers**

Leiden University Medical Center, Leiden University, Leiden, The  
Netherlands

Date: 30 september 2008

## **Summary and Samenvatting**

Chapter 1 provides a general introduction to immune responses evoked by helminths. It describes how the helminth-induced Th2 and immunomodulatory responses affect immune responses to other infections (bacterial, viral, parasitic), to vaccines and to allergens as well as possible self antigens. In addition, the molecular mechanisms involved in immune modulation are reviewed, with a particular focus on the modulation of dendritic cell (DC) function. The effect of DC maturation as well as the role of Toll-like receptors and downstream MAP kinase activation in shaping the dendritic cell function have been described.

In chapter 2 the presence of specific antibodies against *Ascaris lumbricoides* derived glycolipids in patients infected with this helminth were studied. The highest IgG reactivity to glycolipids was found in children carrying heavy infections, compared to lightly-infected or uninfected children. Substantial IgG antibody reactivity to (glyco)proteins was found to be directed to the phosphorylcholine moiety. For glycolipids this was even more pronounced, as removal of the phosphorylcholine moieties by hydrofluoric acid treatment abrogated IgG antibody reactivity. For helminth infections, IgG4 has been associated with susceptibility to reinfection after treatment, whereas IgE is thought to be protective against reinfection. Measurement of IgG4 and IgE isotypes showed no IgG4 reactivity to *Ascaris* glycolipids, but indicated increased IgE responses in subjects with

light or no *Ascaris* infections, suggesting that IgE responses to glycolipids may play a role in controlling parasite burden.

In chapter 3 the difference in efficacy of vaccination with a trivalent influenza vaccine in children living in a rural area, with a high prevalence of helminth infections, compared to a semi-urban area, with a lower prevalence of helminth infections, was compared. First it is described that, unexpectedly, anti-influenza antibody levels before vaccination were present in all children, indicating that influenza viruses had been circulating previously. Cytokine responses were induced within a week after vaccination and showed a Th2 bias in rural children; more IL-5 and less IFN- $\gamma$ . Antibody levels were significantly increased in both rural and semi-urban children after vaccination and reached significantly higher levels for the semi-urban children compared to the rural children one month after vaccination for 2 of the strains. However, post vaccination responses to the third strain (H3N2) were higher in the rural cohort compared to semi-urban group. The extremely high pre-vaccination levels specific for this strain meant that it had caused a very recent epidemic, and although purely speculation, this might indicate that recently memory is boosted more strongly in rural areas. The exact role of parasite infections in the differential response between rural and semi-urban children needs to be investigated in an appropriately powered study. However, for the H1N1 strain helminth infection in semi-urban children reduced the anti-H1N1 antibody levels compared to non-infected semi-urban children. Malaria infection in rural children suppressed antibody responses to the H1N1 strain. Overall, influenza vaccination induced weaker responses in rural compared to a semi-urban population of Gabonese schoolchildren.

In chapter 4 the immune responses induced upon vaccination with tetanus vaccine in children from rural and semi-urban areas of Gabon is described. The same population as described in chapter 3 was studied and similarly, also in response to tetanus toxoid, more IL-5 and less IFN- $\gamma$ , indicating a Th2 biased immune response, was found in the rural children. However, to this vaccine higher antibody levels were found also in the rural group. Total IgG as well as antigen specific subclasses of the IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 isotype and the avidity of the dominating IgG1 subclass were determined. For these, differences between rural and semi-urban children were found one month after vaccination for tetanus-specific IgG1 and IgG3; both were higher in the rural children. This might be in line with the finding in Chapter 3, that vaccine induced responses to the recently circulating influenza H3N2, were also higher in rural children. Subjects with

plasmodium infections showed higher levels of IgG3, but multivariate linear regression analysis showed that this could not account for the difference in anti-TT IgG3 between the rural and the semi-urban children. Furthermore, current helminth infections could also not explain the difference between rural and semi-urban responses. This indicates that other environmental influences and/or the history of helminth infection might be important factors that could explain the Th2 and stronger antibody responses upon a tetanus booster vaccination in rural compared to semi-urban children.

To link immune responses to lipids derived from helminths and *in vivo* vaccination responses in areas where helminth infections are highly prevalent, dendritic cells, which are central to the immune system, were studied. In chapter 5 the pathways within dendritic cells that are activated by helminth derived lipids are described. The lipid fractions of both *Schistosoma mansoni* and *Ascaris lumbricoides* activate Toll Like Receptor 2. Activation of this receptor is an important step in the initiation of an appropriate adaptive immune response. However, several ligands activate TLR2 and these can have different effects on immune polarization. Dendritic cell activation by both helminth derived (Th2 inducing) and bacterial (Th1 inducing) TLR2 ligands was studied and the molecular profile of these DCs was determined. It was found that the MAP kinase activation correlated with the T cell polarizing effects. Thus, the bacterial ligands showed a low *p*-ERK/*p*-p38 ratio, whereas this was high for the helminth derived lipids. However, unlike a schistosomal egg extract (SEA) that increases this ratio by increasing the amount of activated ERK, the lipids specifically reduced the phosphorylation of p38. In addition, mRNA expression profiles were very different. Most clearly, notch ligand delta-4 was associated with a Th1 polarization and transcription factor c-fos showed a strong correlation with Th2 responses. The overall profile of the two Th1 inducing bacterial TLR2 ligands was very similar, whereas the Th2 promoting lipid extracts showed a profile closer to that of SEA. Thus, the activation of TLRs within different antigenic mixtures can lead to very different polarization of the immune system, which can be explained by involvement of additional receptors. More importantly, the molecular signature of the DCs upon activation by antigenic mixtures can be used to predict the polarizing capacity of those compounds.

## **Samenvatting**

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie tot de immuunresponsen die worden opgewekt door helminthen; wormen, waarvan de meeste soorten

parasitair zijn. Twee typen zijn te onderscheiden: T helper 2 (Th2) responsen en immuunsysteem regulerende responsen. Beide typen responsen zijn niet alleen gericht tegen de helminth maar ook tegen ongerelateerde immuunactiverende organismen of moleculen. Er wordt beschreven hoe de helminthen de immuunresponsen beïnvloeden die gericht zijn tegen a) andere infecties (bacterieel, viraal of parasitair), b) vaccins, c) allergenen of d) mogelijke zelf-antigenen. Verder worden de moleculaire mechanismen beschreven die een rol spelen in deze regulering van het immuunsysteem, waarbij de nadruk ligt op de modulering van de functie van dendritische cellen (DCs). Tevens wordt beschreven wat het effect is van helminth infectie op de maturatie van DCs, met aandacht voor de rol van Toll-like receptoren en de daarop volgende activering van MAP kinases, in het vormen van de immuun-regulerende eigenschappen van de DCs.

In hoofdstuk 2 is de aanwezigheid van specifieke antilichamen tegen glycolipiden van *Ascaris lumbricoides* bestudeerd in patiënten die geïnfecteerd waren met deze helminth. De hoogste IgG reactiviteit tegen glycolipiden werd gevonden in kinderen met zware infecties, in vergelijking met kinderen met een lichte of geen infectie. Een aanzienlijk deel van de reactiviteit van de IgG antilichamen tegen de (glyco)proteïnen was gericht tegen phosphorylcholine eenheden. Voor glycolipiden was de rol van phosphorylcholine nog groter; na verwijdering van de phosphorylcholine eenheden was de reactiviteit van de IgG antilichamen zo goed als verdwenen. In infecties met helminthen wordt de aanwezigheid van de subklasse IgG4 geassocieerd met gevoeligheid voor de terugkeer van infecties na behandeling, terwijl IgE in verband gebracht wordt met resistentie tegen terugkerende infecties. Bepaling van de IgG4 en IgE isotypen toonde aan dat er geen reactiviteit van IgG4 tegen glycolipiden van *Ascaris* was, maar dat er wel verhoogde IgE responsen waren in kinderen met lichte of geen *Ascaris* infecties. Dit zou kunnen betekenen dat IgE responsen tegen glycolipiden een rol spelen in het inperken van deze parasitaire infectie.

In hoofdstuk 3 is het verschil in effectiviteit van vaccinatie met een trivalent influenza vaccin bestudeerd in kinderen afkomstig uit twee verschillende gebieden in Gabon; een ruraal gebied, met een hoge prevalentie van helminth infecties, en een verstedelijkt gebied, waar helminth infecties minder vaak voorkomen. Tegen de verwachting in werd geconstateerd dat in alle kinderen al voor de vaccinatie antilichamen gericht tegen influenza aanwezig waren. Dit duidt er op dat influenza virussen recent gecirculeerd hebben in deze gebieden. Na vaccinatie waren de hoeveelheden

antilichaam significant toegenomen in zowel de kinderen uit het rurale als het verstedelijkte gebied. Voor twee van de drie influenza stammen waren de niveaus van de antilichamen een maand na de vaccinatie significant hoger in de kinderen uit het verstedelijkte gebied dan in de kinderen uit het rurale gebied. Echter, de antilichaamresponsen specifiek voor de derde stam (H3N2) waren juist hoger in de kinderen uit het rurale gebied. De extreem hoge titers tegen deze stam die al voor de vaccinatie aanwezig waren duiden op een recente epidemie en, hoewel dit speculatief is, dit zou kunnen betekenen dat het immunologisch geheugen recent sterker gestimuleerd is in de kinderen in het rurale gebied. Verder zijn na de vaccinatie de influenza specifieke cytokine responsen gemeten en deze vertoonden een Th2 type profiel in kinderen uit het rurale gebied: meer IL-5 en minder IFN- $\gamma$  in vergelijking met de kinderen uit het verstedelijkte gebied. In theorie zou voor een goede respons tegen influenza juist een Th1 respons gewenst zijn. De exacte rol van parasitaire infecties in het verschil in responsen tussen kinderen uit het rurale en het verstedelijkte gebied dienen in een nieuwe studie met grotere aantallen kinderen onderzocht te worden. Wel waren er in deze studie al aanwijzingen dat de kinderen uit het verstedelijkte gebied met een helminth infectie minder anti-H1N1 antilichamen aanmaakten in vergelijking met kinderen uit hetzelfde gebied zonder een helminth infectie. Bovendien onderdrukte een infectie met malaria, geconstateerd voor of binnen 2 weken na de vaccinatie, de antilichaam responsen tegen de H1N1 stam in de kinderen uit het rurale gebied. Samenvattend wekte het influenza vaccin zwakkere responsen op in schoolkinderen uit een ruraal gebied dan in kinderen uit een verstedelijk gebied in Gabon.

In hoofdstuk 4 is gekeken naar immuunresponsen in kinderen uit een ruraal en een verstedelijk gebied in Gabon na vaccinatie met een tetanus vaccin. De groep kinderen was dezelfde als die beschreven is in hoofdstuk 3. Net als voor influenza, werd er in de kinderen uit het rurale gebied ook in reactie op tetanus toxoid meer IL-5 en minder IFN- $\gamma$  aangemaakt. Echter, tegen tetanus toxoid werden sterkere antilichamen gevonden in de groep rurale kinderen. Antigen specifiek totaal IgG, subklassen van het IgG1, IgG2, IgG3 en IgG4 isotype en de aviditeit van de dominerende IgG1 subklasse werden bepaald. Er werden verschillen gevonden in tetanus specifiek IgG1 en IgG3 tussen kinderen uit het rurale en het verstedelijkte gebied één maand na de vaccinatie; beide antilichamen waren in hogere mate aanwezig in de kinderen uit het rurale gebied. Aangezien kinderen uit de rurale gebieden vaker infecties oplopen, en dit ook voor tetanus het geval zou kunnen zijn, zou de verhoogde antilichaamrespons in de rurale

kinderen in overeenstemming kunnen zijn met de bevindingen in hoofdstuk 3, waar de responsen tegen de recent aanwezige influenza H3N2 stam, geïnduceerd door vaccinatie, ook hoger waren in de kinderen uit het rurale gebied. Kinderen met malaria hadden grotere hoeveelheden IgG3, maar lineaire regressie analyse toonde aan dat malaria infecties niet het verschil in tetanus specifiek IgG3 tussen de kinderen uit het rurale en het verstedelijkte gebied kon verklaren. Ook konden aanwezige helminth infecties niet de verschillen tussen de twee groepen verklaren. Dit wijst erop dat andere omgevingsfactoren en/of de voorgeschiedenis van helminth infecties belangrijke factoren zouden kunnen zijn die de Th2 en sterkere antilichaam responsen in kinderen uit een ruraal gebied na een booster vaccinatie met tetanus vaccin zouden kunnen verklaren.

Om de immuunresponsen tegen lipiden geïsoleerd uit helminthen (hoofdstuk 2) en de *in vivo* responsen tegen vaccinatie in gebieden waar helminth infecties heersen (hoofdstuk 3 en 4) aan elkaar te kunnen liëren, werden dendritische cellen bestudeerd. Dendritische cellen (DCs) spelen een centrale rol in het immuunsysteem. Wanneer ze in aanraking komen met bijvoorbeeld ziekteverwekkers, zullen naïve DCs hun aanwezigheid opmerken en matureren. Deze “volwassen” DCs zullen vervolgens de witte bloedcellen (T en B cellen) instrueren hoe ze moeten handelen. In hoofdstuk 5 worden de routes in de DCs beschreven die geactiveerd worden door lipiden afkomstig van helminthen. De lipiden fracties van twee verschillende parasitaire wormen, *Schistosoma mansoni* en *Ascaris lumbricoides*, activeren een receptor op het oppervlak van de DCs, genaamd Toll Like Receptor 2 (TLR2). Activering van deze receptor is een belangrijke stap in de initiatie van een passende specifieke immuunrespons. Echter, er zijn verschillende liganden die TLR2 kunnen activeren en deze kunnen uiteenlopende effecten hebben op de sturing van de immuunrespons. Activering van DCs door zowel Th2 inducerende, van helminthen afkomstige liganden, als Th1 inducerende, van bacteriën afkomstige TLR2 liganden, werden gebruikt om DCs te activeren en het moleculaire profiel van deze DCs werd geanalyseerd. Activering van TLR2 leidt tot activering van andere moleculen die op hun beurt weer de volgende signaalmoleculen in de route kunnen activeren. Een groep van enzymen die ook deel uitmaken van deze cascade zijn de “mitogen-activated protein kinases” (MAP kinases). Activering van de MAP kinases in de DCs was in overeenstemming met de effecten die deze DCs hadden op T cel polarisatie. Ofwel, de bacteriële liganden toonden een lage ratio van twee verschillende MAP kinases ( $p$ -ERK /  $p$ -p38), terwijl deze ratio hoog was voor zowel lipiden afkomstig van de helminthen, als voor SEA, een veel bestudeerd extract uit eieren van schistosomen. SEA verhoogt de

$p$ -ERK /  $p$ -p38 ratio door het verhogen van de hoeveelheid geactiveerd ERK, terwijl de lipiden juist de hoeveelheid geactiveerd p38 verlagen. Naast de verschillen in activering van eiwitmoleculen waren ook de expressieprofielen van messenger RNA (mRNA) erg verschillend tussen de Th1 en Th2 inducerende TLR2 liganden. Het meest in het oog springende resultaat was dat delta-4, een ligand van de notch receptor, geassocieerd was met Th1 polarisatie en dat de transcriptiefactor c-fos sterk geassocieerd was met een Th2 respons. Het mRNA profiel van de DCs geactiveerd met de twee Th1 inducerende bacteriële TLR2 liganden was erg vergelijkbaar, terwijl de lipiden een profiel in de DCs opwekten dat meer overeen kwam met dat geïnduceerd door SEA. Concluderend kan worden gezegd dat de activering van hetzelfde type TLR in de aanwezigheid van verschillende mixen van antigenen kan leiden tot een sterk verschillende polarisatie van het immuunsysteem. Bovendien kan het moleculaire profiel van de DCs gebruikt worden om de polariserende eigenschappen van deze stoffen te voorspellen.