

# Summary

---

African trypanosomes are blood-borne protozoan parasites that infect both human and livestock in Sub-Saharan Africa through the bite of their vector, the tsetse fly. While only infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. gambiense*, can cause Human African Trypanosomiasis (HAT), certain cattle breeds and other livestock animals are threatened by infections caused by *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, and *T. brucei brucei*. In natural hosts, a fatal outcome of the disease is not caused by a high parasite load, but rather by the induction of immunopathology, with dysregulation of the B cell system and anemia being two key problems. While research by our group already demonstrated an essential role for the pro-inflammatory cytokine TNF in the induction of infection-associated anemia, the mechanism behind the TNF-dependent induction of anemia remained unclear. Furthermore, while efficient parasitemia control is dependent on trypanosome-specific antibodies, both natural and experimental infections have revealed that infection induces several defects in the B cell compartment of the immune system, including polyclonal activation, deletion of mature MZB and FoB cells from the spleen and the loss of B cell memory responses against previously encountered antigens.

Here, we show that infection with *T. brucei* results in a severe dysregulation of B lymphopoiesis, as evidenced by an inhibition of B cell development in the bone marrow, the occurrence of extramedullary splenic B lymphopoiesis and the strong depletion of transitional B cells in the spleen that is the result of massive apoptosis induction within this population. Interestingly, the induction of transitional B cell apoptosis occurs independent from both the TNF and Fas apoptosis pathways, but is dependent on cell-cell contact between trypanosome parasites and spleen cells.

While the infection-associated depletion of MZB cells is largely dependent on the induction of MZB cell apoptosis, induction of apoptosis is only limited in the FoB cell population. Therefore, the mechanism behind the infection-associated depletion of FoB cells in the spleen was further analyzed in depth. We discovered that the depletion of FoB cells is caused by a mechanism dependent on TLR2 and/or 4 and the pro-inflammatory cytokine IFN- $\gamma$ , but occurs independent from TNF. In addition, high numbers of class-switched plasma B cells are observed in the spleen of wild type mice, but not IFN- $\gamma$  deficient mice, suggesting that IFN- $\gamma$  might drive the polyclonal activation of FoB cells and their differentiation into end-stage plasma B cells, which is most likely the cause of FoB cell depletion. This hypothesis is supported by the results of a MicroArray analysis that revealed a strong proliferative and anti-apoptotic, almost "lymphoma-like", character of FoB cells isolated from infected mice.

During *T. brucei* infection IL-10 is crucial to prevent death of the host from hyperinflammation after the first peak of parasitemia, yet the cellular source of IL-10 had so far not been identified. Here, we show that two phenotypically different CD1d-negative 'DC-like' populations of IL-10 producing B cells, a B220<sup>int</sup>CD19<sup>hi</sup> and B220<sup>low</sup>CD19<sup>int</sup> population, are the main producers of IL-10 in the spleen of *T. brucei*-infected mice. In addition, up to our knowledge we are

the first to describe the occurrence of IL-10 producing regulatory T cells in the liver following *T. brucei* infection.

Previous results obtained by our group have shown that vaccine-induced specific B cell memory responses were lost in *T. brucei* infected mice that had been treated with diminazene aceturate (DA). Therefore, it is essential to know whether treatment of *T. brucei* infection with DA allows restoration of the infection-induced dysregulation of B lymphopoiesis in the bone marrow and the depletion of transitional B cells and mature MZB and FoB cells in the spleen. We demonstrate here that B lymphopoiesis in the bone marrow is fully restored within one week after treatment, while a complete recovery of the transitional B, MZB and FoB cell populations was observed in the spleen within three weeks after treatment.

While wild type mice suffer from severe *T. brucei* infection-associated anemia that starts after the first peak of parasitemia is reached, TNF<sup>-/-</sup> mice suffer from much less anemia during infection. Here, we show that TNF, signaling through TNF-R1, plays an essential role in the induction of anemia following *T. brucei* infection by inducing erythrocyte trapping in the spleen that is most likely the result of erythrocyte adhesion to VCAM-1, which becomes strongly upregulated during infection by TNF.

Viki Bockstal

## Samenvatting

---

Afrikaanse trypanosomen zijn extracellulaire protozoa parasieten die zowel mensen als vee infecteren via een beet van hun vector, de tsetse vlieg, in Afrikaanse gebieden onder de Sahara. De menselijke vorm van Afrikaanse trypanosomiase wordt enkel veroorzaakt door infectie met *Trypanosoma brucei rhodesiense* of *T. b. gambiense* parasieten, maar bepaalde rundersoorten en vee worden bedreigd door infectie met *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, and *T. brucei brucei* species. In natuurlijke gastheren wordt een dodelijke afloop van de ziekte niet veroorzaakt door een hoge parasitemie, maar eerder door de inductie van immunopathologie, waarbij dysregulatie van het B cel systeem en anemie twee belangrijke problemen vormen. Hoewel onderzoek door onze groep reeds aangetoond heeft dat het pro-inflammatoire cytokine TNF een essentiële rol speelt in de inductie van infectie-geassocieerde anemie, is het mechanisme hierachter nog niet duidelijk. Bovendien, terwijl efficiënte parasitemie controle afhankelijk is van trypanosoom-specifieke antilichamen, hebben zowel natuurlijke als experimentele infecties al aangetoond dat trypanosoom infectie verschillende defecten in het B cell compartiment van het immuunsysteem veroorzaakt, waaronder polyclonale activatie, deletie van mature MZB en FoB cellen in de milt en het verlies van B cell geheugen tegen antigenen waarmee het lichaam reeds in contact was geweest.

In deze thesis tonen wij aan dat infectie met *T. brucei* resulteert in een dysregulatie van de B cell ontwikkeling, wat de inhibitie van B cel ontwikkeling in het beenmerg, de inductie van extramedullaire B cel ontwikkeling in de milt, als eveneens een sterke depletie van transitionele B cellen in de milt inhoudt. Deze depletie van transitionele B cellen in de milt wordt veroorzaakt door een sterke inductie van apoptose binnen deze populatie. Bovendien blijkt de inductie van transitionele B cel apoptose onafhankelijk van de TNF en Fas apoptose pathway te verlopen, en eerder veroorzaakt te worden door cel-cel contact tussen trypanosome parasieten en milt cellen.

Terwijl de infectie-geassocieerde depletie van MZB cellen voornamelijk veroorzaakt wordt door apoptose, blijkt de inductie van apoptose in de FoB cell populatie eerder beperkt te zijn. Daarom hebben we het mechanisme achter de infectie-geassocieerde depletie van FoB cellen hier verder uitgediept. We hebben ontdekt dat de depletie van FoB cellen wordt veroorzaakt door een mechanisme dat afhankelijk is van TLR2 en/of 4 en het pro-inflammatoire cytokine IFN- $\gamma$ , maar onafhankelijk van TNF. Daarnaast werden grote aantallen "class-switched" plasma B cellen waargenomen in de milt van wild type muizen, maar niet in IFN- $\gamma^{-/-}$  muizen. Dit suggereert dat IFN- $\gamma$  misschien de drijvende factor is van de polyclonale activatie van B cellen en hun differentiatie naar eind-stadium plasma B cellen induceert, wat hoogstwaarschijnlijk de oorzaak van de FoB cel depletie in de milt is. Deze hypothese wordt gesteund door de resultaten van een MicroArray analyse die aantoonde dat FoB cellen

geïsoleerd van geïnfecteerde muizen een sterk proliferatief en anti-apoptotisch, bijna "lymfoma-achtig", karakter hebben.

Tijdens *T. brucei* infectie is het anti-inflammatoire cytokine IL-10 essentieel om hyperinflammatie te voorkomen na de eerste piek van parasitemie, wat tot de dood van de gastheer kan leiden. Maar, tot nu toe was de cellulaire bron van IL-10 tijdens *T. brucei* infectie nog onbekend. Hier tonen wij aan dat twee phenotypisch verschillende CD1d-negatieve "DC-achtige" populaties van IL-10 producerende B cellen, een B220<sup>int</sup>CD19<sup>hi</sup> en een B220<sup>low</sup>CD19<sup>int</sup> populatie, de belangrijkste producenten van IL-10 zijn in de milt van *T. brucei* geïnfecteerde muizen. Bovendien zijn wij, voor zover we weten, de eerste om de aanwezigheid van IL-10 producerende regulatorische T cellen in de lever tijdens *T. brucei* infectie te beschrijven.

Resultaten behaald door onze groep hebben in het verleden aangetoond dat vaccin-geïnduceerde specifieke B cell geheugen responsen verloren gaan in *T. brucei* geïnfecteerde muizen die behandeld waren met diminazene actetaat. Daarom is het belangrijk te weten of een behandeling van *T. brucei* infectie met diminazene acetaat een volledig herstel toelaat van de infectie-geïnduceerde dysregulatie van de B cel ontwikkeling in het beenmerg en de depletie van transitionele B cellen en mature MZB en FoB cellen in de milt. In deze thesis tonen wij aan dat de B cel ontwikkeling volledig hersteld is binnen één week na behandeling, terwijl een volledig herstel van de transitionele B, MZB en FoB cel populaties in de milt werd waargenomen binnen de 3 weken na behandeling.

Terwijl wilde type muizen lijden aan een erge vorm van anemie tijdens *T. brucei* infectie die start nadat de eerste piek van parasitemie is bereikt, lijden geïnfecteerde TNF<sup>-/-</sup> muizen aan veel minder anemie. Hier tonen we aan dat TNF, via TNF-R1 signalisatie, een essentiële rol speelt in de inductie van anemie tijdens *T. brucei* infectie en verantwoordelijk is voor de inductie van erythrocyt verstrikking in de milt die hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt wordt door de adhesie van erythrocyten aan VCAM-1, wat sterk opgereguleerd wordt tijdens infectie onder invloed van TNF.

Viki Bockstal