

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19067> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Meevissen, Moniek Hubertina Joanna

Title: Schistosoma mansoni egg glycoproteins : glycan structures and host immune responses

Issue Date: 2012-06-13

Nederlandse samenvatting

Schistosomen zijn parasitaire wormen die in veel tropische en sub-tropische landen voor grote medische en sociaal-economische problemen zorgen. In het geval van *Schistosoma mansoni*, een van de drie belangrijkste schistosoom soorten die mensen infecteren, start de infectie als cercariën de huid binnendringen. Eenmaal in het lichaam verplaatsen ze zich naar de lever, terwijl ze zich ontwikkelen tot volwassen wormen. Een volwassen vrouwelijke en mannelijke worm vormen een paartje en beginnen eieren te produceren. Een substantieel deel van deze eieren verlaat het menselijk lichaam om de levenscyclus te vervolgen, maar een ander deel loopt vast in de lever en andere organen. De menselijke gastheer reageert op deze eieren door middel van een Th2-gemedieerde granulomateuze immuunrespons, die kan leiden tot pathologische weefselveranderingen, fibrose, ernstige orgaanschade en in sommige gevallen zelfs tot de dood.

De meerderheid van de moleculaire en immunologische *S. mansoni* ei-gerelateerde studies is uitgevoerd met behulp van SEA (oplosbare -Soluble- Ei Antigenen). SEA is een experimenteel mengsel van oplosbare ei proteïnen en glycoproteïnen. Een deel van de immunologische activiteit geassocieerd met *S. mansoni* eieren wordt gemedieerd door de glycosylering op de SEA glycoproteïnen. **Hoofdstuk 1** geeft een uitgebreid overzicht van de immunologische capaciteiten van SEA en van de huidige kennis over immunogene SEA glycanen en glycoproteïnen. Dit hoofdstuk beschrijft daarnaast de meest gangbare massa spectrometrie (MS) methoden die gebruikt worden om glycaan structuren op ei glycoproteïnen te identificeren.

Er zijn drie belangrijke, immunogene glycoproteïnen in SEA geïdentificeerd; omega-1, IPSE/α1 and kappa-5. De studies die in dit proefschrift worden beschreven richten zich op de structurele en moleculaire details van deze drie glycoproteïnen en hun interacties met de immuunsystemen van de mens en de muis. In **hoofdstuk 2 en 3** hebben we met behulp van MS de glycosylering van omega-1 en kappa-5 bestudeerd. Om site-specifieke glycosylerings informatie te verkrijgen, zijn de glycoproteïnen behandeld met trypsine en geanalyseerd met nano-LC-MS en MALDI-TOF-MS. Daarnaast is gebruik gemaakt van tandem mass analyse, exoglycosidase behandelingen en anti-glycaan antilichamen om de structurele details te ontrafelen. Het blijkt dat omega-1 twee glycosylerings sites bevat die voor het grootste deel bezet zijn met diantennaire N-glycanen van het complexe type (**hoofdstuk 2**). De antennes bestaan voornamelijk uit Lewis X en N-acetyllactosamine structuren, en voor een kleiner gedeelte uit (gefucosyleerde) LDN structuren. De core van de meeste omega-1 glycanen is bezet een α3- en een α6-gebonden fucose. Interessant is dat de glycosylering van IPSE/α1, die al eerder is geanalyseerd met behulp van een vergelijkbare methode, erg lijkt op die van omega-1. Kappa-5



bevat daarentegen een compleet verschillende set glycanen (**hoofdstuk 3**). Dit glycoproteïne draagt voornamelijk triantennaire N-glycanen met LDN antennes, waarvan een klein gedeelte nog een extra α 3-fucose op de GlcNAc heeft (LDN-F). Net als omega-1 en IPSE/ α 1 hebben de meeste kappa-5 glycanen twee α 3/ α 6-gebonden fucoses op de core, maar kappa-5 glycanen dragen nog een extra xylose op de β 4-gebonden mannose. We laten in hoofdstuk 3 ook zien dat kappa-5 het belangrijkste, LDN-bevattende glycoproteïne in SEA is.

SEA glykaan motieven worden voornamelijk herkend door C-type lectine receptoren (CLRs), die zich bevinden op het oppervlak van antigeen-presenterende cellen (APCs). APCs zijn een type immuuncellen waaronder onder meer de dendritische cellen (DCs) vallen. SEA glycoproteïnen induceren responsen in DCs die leiden tot een karakteristieke Th2 polarisatie van het immuunsysteem van de gastheer. De herkenning en opname van SEA glycoproteïnen door DCs wordt voor een groot deel bepaald door drie CLRs; DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), mannose receptor (MR) and macrophage galactose-type lectin (MGL). In **hoofdstuk 4** hebben we de binding van deze drie receptoren aan natuurlijk IPSE/ α 1 and kappa-5 onderzocht. Om de structurele elementen te definiëren die betrokken zijn bij de binding aan de drie receptoren, zijn varianten van IPSE/ α 1 en kappa-5 gemaakt met behulp van exoglycosidase digesties. In **hoofdstuk 5** hebben we een soortgelijke strategie gebruikt om de binding van omega-1 aan DC-SIGN en MR te onderzoeken. Het blijkt dat IPSE/ α 1 en omega-1 voornamelijk door DCs worden herkend via de interactie van LeX op deze ei glycoproteïnen met de MR op DCs. Bij de binding van DCs aan IPSE/ α 1 zijn daarnaast DC-SIGN en MGL betrokken, alhoewel in veel mindere mate. Kappa-5 wordt in vergelijkbare mate herkend door zowel DC-SIGN, MR en MGL op DCs. Daarnaast zijn nog andere, Ca^{2+} -onafhankelijke, receptoren betrokken bij de herkenning van kappa-5 door DCs. De binding tussen kappa-5 en DC-SIGN wordt gemedieerd door LDN-F, terwijl bij de kappa-5-MR binding mogelijk de LDN-F danwel de fucoses en/of xylose op de chitobiose core betrokken zijn. De binding van MGL aan kappa-5 gaat via de LDN en LDN-F motieven. De binding studies van **hoofdstuk 4 en 5** geven een moleculaire basis voor de CLR-gemedieerde interactie tussen DCs en individuele schistosoom ei glycoproteïnen.

Het is al eerder vastgesteld dat het SEA mengsel een Th2-polariserend effect heeft. Echter, de SEA moleculen die verantwoordelijk zijn voor dit effect waren nog onbekend. Recent is gebleken dat omega-1 een belangrijke component in SEA is die Th2 responsen kan induceren via functionele modulatie van DCs. In **hoofdstuk 5** beschrijven we twee eigenschappen van omega-1 die betrokken zijn bij dit proces: glycosylering en RNase activiteit. De glycosylering van omega-1, en meer specifiek de interactie tussen LeX op omega-1 en MR op DCs, is nodig voor de internalisatie van omega-1 in DCs. Eenmaal in de cel, blokkeert de RNase activiteit van

omega-1 de proteïne productie via de afbraak van ribosomaal RNA. Dit leidt uiteindelijk tot de conditionering van DCs voor Th2 polarisatie. De immunologische data die in **hoofdstuk 5** worden beschreven bevatten nieuwe inzichten in de moleculaire processen die leiden tot de inductie van Th2 responsen.

Bij de bestudering van granuloomvorming rondom *S. mansoni* eieren wordt vaak gebruik gemaakt van muis modellen waarbij Sepharose partikels in the lever of longen worden gespoten. Aan de partikels kunnen verscheidene schistosoom ei moleculen worden gekoppeld, waardoor identificatie van natuurlijke granuloma-inducerende en -modulerende moleculen mogelijk wordt. Met behulp van een dergelijk model is eerder aangetoond dat SEA granulomen kan induceren, en dat dit afhankelijk is van glycosylering. Daarnaast is ook gebleken dat glycoconjugaten met LDN en *N*-acetyllactosamine een granulomateuze respons kunnen induceren die lijkt op de respons geïnduceerd door SEA. Omdat we in **hoofdstuk 4** lieten zien dat kappa-5 het belangrijkste LDN-bevattende glycoproteïne in SEA is, vermoedden wij dat kappa-5 wellicht een belangrijk granulomogeen molecuul in eieren is. We laten in **hoofdstuk 6** zien dat kappa-5 gekoppeld aan partikels inderdaad granulomen kan induceren in een long model in muizen. We laten verder zien dat deze granulomen eosinofielen bevatten, wat aangeeft dat ze, net als de granulomen rondom eieren en SEA, Th2 gepolariseerd zijn. LDN is deels verantwoordelijk voor het granulomogene effect, aangezien kappa-5 partikels waarvan LDN op enzymatische wijze verwijderd is, minder en kleinere granulomen induceren in vergelijking met onbehandelde kappa-5 partikels. **Hoofdstuk 6** beschrijft kappa-5 als het eerste, natuurlijke *S. mansoni* ei molecuul met glycaan-afhankelijke granulomogene eigenschappen.

Er bestaan verscheidene mechanismen waarop de interacties tussen glycoconjugaten van pathogenen en CLR op immuuncellen kunnen leiden tot immuunmodulatie, zoals de inductie van signaleringsroutes of de internalisatie van bioactieve moleculen. In **hoofdstuk 7** bespreken we, in het licht van de resultaten uit dit proefschrift, de CLR-afhankelijke mechanismen betrokken bij de immunologische effecten van omega-1, IPSE/α1, kappa-5 en gerelateerde pathogene moleculen. We beschrijven ook andere ei glycoconjugaten en glycaan motieven die mogelijk betrokken kunnen zijn bij de immunomodatoire activiteiten van *S. mansoni* eieren.


