



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Circulating gut-associated antigens of *Schistosoma mansoni* : biological, immunological, and molecular aspects

Dam, G.J. van

Citation

Dam, G. J. van. (1995, February 9). *Circulating gut-associated antigens of Schistosoma mansoni : biological, immunological, and molecular aspects*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/41317>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License:

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/41317>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/41317> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dam, G.J. van

Title: Circulating gut-associated antigens of *Schistosoma mansoni* : biological, immunological, and molecular aspects

Issue Date: 1995-02-09

Samenvatting

Het lopende onderzoek naar het verbeteren van diagnostische methoden voor humane schistosomiasis en de studie van de immunologische interactie van de parasiet *Schistosoma* met de gastheer vormen het kader waarbinnen het onderzoek staat dat in dit proefschrift wordt beschreven. In een nog groter verband zouden de resultaten het begrip van de gastheer–parasiet relatie in het algemeen kunnen vergroten en bijdragen tot de verbetering van de diagnostiek of van therapeutische en interventie–strategieën. Vanaf het moment dat circulerende antigenen in *Schistosoma* voor het eerst beschreven werden, is men zich de potentiële waarde ervan bewust geweest voor een immunodiagnostische test voor schistosomiasis. Hoewel er later ook andere circulerende antigenen werden beschreven, zijn twee antigenen het meest uitgebreid bestudeerd, beide glycoconjugaten afkomstig uit de darm van de parasiet: het circulating anodic antigen (CAA) en het circulating cathodic antigen (CCA). De oorsprong, lokalisatie, en een aantal eigenschappen van deze twee darmgebonden antigenen alsmede van een aantal andere antigenen zijn beschreven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift. Dit literatuur–overzicht gaat ook kort in op de immunologische interacties tussen de gastheer en de parasiet en op de mogelijke fysiologische rol van CAA en CCA voor de parasiet zelf.

De componenten van CAA en CCA die zowel immunologisch als structureel het meest belangrijk zijn, bestaan uit koolhydraat–structuren waarvan de karakterisatie een belangrijk deel van dit proefschrift uitmaakt. Daarom is in **hoofdstuk 2** een kort algemeen overzicht gegeven over glycoconjugaten. Er wordt vooral ingegaan op de structuur en op technieken die gebruikt worden voor de structuur–analyse. De voorbeelden die gegeven worden komen vooral uit de parasitologie en het schistosomiasis–onderzoek. Omdat de hoeveelheid gezuiverd antigeen materiaal van parasieten in het algemeen beperkt is, worden er vooral immunochemische methoden (bijv. met behulp van antilichamen of lectines) gebruikt bij de analyse van koolhydraat–structuren van parasitaire antigenen. De meeste resultaten die beschreven zijn voor glycoconjugaten van *Schistosoma* worden samengevat in het tweede deel van **hoofdstuk 2**.



Om de detectie van CAA en CCA te verbeteren is er, gedurende vele jaren van onderzoek, een uitgebreid panel van monoclonale antilichamen (McAbs) geproduceerd, gericht tegen CAA en CCA, maar ook tegen diverse andere *Schistosoma* antigenen. Een analyse van deze anti-CAA en anti-CCA McAbs (respectievelijk 25 en 55 stuks) wordt in **hoofdstuk 3** gepresenteerd. Naast een opmerkelijke isotype restrictie, namelijk dat de McAbs alleen maar het IgM, IgG3 en IgG1 isotype bezaten (anti-CAA McAbs bestonden voor 60% uit IgG1, en anti-CCA voor 80% uit IgM), is er ook, met behulp van verschillende technieken, gevonden dat de anti-CCA McAbs meer verschillende antigenen en epitopen herkenden dan de anti-CAA McAbs.

Om te ontdekken of er ook andere darmgebonden antigenen als mogelijke kandidaten voor immunodiagnostiek konden dienen, is er een studie ondernomen ter analyse van de aanwezige McAbs die wel reageerden met *Schistosoma mansoni* darmgebonden antigenen maar niet met CAA, CCA of de reeds uitgebreid bestudeerde darm proteases. Het resultaat van deze studie, dat in **hoofdstuk 4** is beschreven, ondersteunde de belangrijke rol voor CCA als immunodominant antigeen in experimentele en humane infecties. Ook werden er een aantal klassieke, maar toch interessante, door antigenen gestuurde, isotype-restricties gevonden, bijv. dat significant meer IgM McAbs dan IgG McAbs koolhydraat epitopen herkenden die gemeenschappelijk voorkwamen op darmgebonden en ei-schaal antigenen.

De toepassing van het FITC-anti-FITC systeem als een technische verbetering en alternatief voor de ultrastructurele lokalisatie van antigenen is beschreven in **hoofdstuk 5**. Er worden twee voorbeelden van toepassingen van het systeem gegeven voor de detectie van antigenen in coupes van volwassen *S. mansoni* wormen: 1. detectie van CCA met een anti-CCA McAb dat met FITC gemerkt is, gevolgd door een met goud gemerkt anti-FITC McAb; en 2. detectie van diverse antigenen door humane IgM antilichamen in gepoolde sera van met *Schistosoma*-geïnfecteerde patiënten, gevolgd door een met FITC gemerkt anti-humaan IgM antiserum en daarna eveneens een met goud gemerkt anti-FITC McAb.

De routine-diagnostiek van schistosomiasis binnen ons laboratorium is voornamelijk gebaseerd op de serologische detectie van humane IgM antilichamen tegen darmgebonden antigenen door middel van een immunofluorescentie assay (IFA) op coupes van volwassen wormen. Al eerder was met inhibitie-studies aangetoond dat deze IgM antilichamen vooral gericht waren tegen CCA. Om enerzijds de IgM respons tegen CCA meer specifiek te bestuderen en anderzijds de IFA voor gebruik op grotere schaal te standaardiseren en te vereenvoudigen, zijn er drie ELISA's ontwikkeld die gebruik maken van gezuiverd CCA (**hoofdstuk 6**). In alle drie assays was de intra- en inter-assay variatie lager dan 5% en werden er geen vals negatieven gevonden.

In twee van de drie assays (directe CCA- en indirecte CCA-coat) werd er één vals positief monster gevonden. Om deze redenen, alsmede vanwege praktische en economische voordelen is de antilichaam-capture assay uiteindelijk geselecteerd.

De toepassing van CAA- en CCA-specifieke McAbs heeft de immunozuivering mogelijk gemaakt van hoeveelheden CAA en CCA die voldoende groot waren voor gedetailleerde structuur-analyse. De primaire structuren van de koolhydraat-gedeelten die immunodiagnostisch en immunologisch het meest relevant zijn, zijn beschreven in de **hoofdstukken 7 en 8**. We konden aantonen dat de voornaamste koolhydraat-structuren van CCA O-glycosidisch gebonden (via Thr) polysacchariden zijn die de Lewis x trisaccharide als repeterende eenheid bevatten $(\rightarrow 3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)[\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 3)]\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow)$ en GalNAc als de monosaccharide aan het reducerende einde. De kleinere koolhydraat fractie bevatte disaccharide tot hexasaccharide structuren met een gemeenschappelijke $\text{Gal}\beta(1\rightarrow 3)\text{GalNAc-OL}$ kern. De voornaamste koolhydraat ketens van CAA zijn Thr-gebonden polysacchariden bestaande uit repeterende eenheden van de disaccharide $\rightarrow 6)[\text{GlcA}\beta(1\rightarrow 3)]\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow)$, waarschijnlijk gebonden aan het eiwit via een nog onbekende kernstructuur met GlcNAc aan het reducerende einde. De detectie in CAA van kleine hoeveelheden (<5%) CCA-specifieke O-gebonden polysacchariden met Lewis x als repeterende eenheid, zou de in het algemeen waargenomen kruisreactiviteit van anti-CCA McAbs met intact CAA kunnen verklaren.

Omdat de koolhydraat structuur van CCA overeenkomsten vertoont met een belangrijk oppervlakte-antigeen van granulocyten, en omdat in schistosomiasis patiënten meestal een significante IgM respons tegen CCA waargenomen wordt alsmede een verlaagd aantal neutrofielen, is de mogelijke rol van anti-CCA antilichamen bij granulocytotoxiciteit onderzocht (**hoofdstuk 9**). Er kon worden aangetoond, dat anti-CCA McAbs, in de aanwezigheid van complement, lysis van granulocyten veroorzaken. Een identiek effect werd waargenomen voor gezuiverde anti-CCA IgM antilichamen in sera van schistosomiasis patiënten.

Met behulp van gezuiverde antigenen en specifieke McAbs, werd er gevonden dat alleen CAA en niet CCA een interactie aangaat met de eerste component van het complement systeem, C1q (**hoofdstuk 10**). Door het toepassen van gezuiverde C1q fragmenten in ELISA kon bewezen worden dat de interactie van C1q met CAA plaatsvindt via de collageen-achtige stelen van C1q. Deze interactie lijkt op die van de binding van C1q met zijn C1q-receptor, op bijv. monocytten, neutrofielen, en bloedplaatjes. Normaliter worden de cellen door deze interactie geactiveerd, wat gevolgd wordt door antilichaam-afhankelijke cytotoxiciteit. Interferentie van CAA met deze C1q-C1q-receptor interactie zou deze cellulaire cytotoxiciteit kunnen verminderen.



Tenslotte, om een bijdrage te leveren aan de studie van de fysiologische rol van CAA en CCA, zijn de *in vivo* en *in vitro* excretie–patronen van CAA en CCA zowel door net–getransformeerde en ontwikkelende schistosomula als door 7–weken oude volwassen wormen onderzocht en bediscussieerd met betrekking tot opruimings (clearance)–mechanismen (**hoofdstuk 11**). Er werd gevonden dat *in vitro*, gedurende de eerste dagen van ontwikkeling, meer CAA dan CCA wordt geproduceerd, maar dat na ongeveer een week deze verhouding al omgekeerd is. Volwassen wormen, geïsoleerd uit geïnfecteerde hamsters en *in vitro* gekweekt, produceren ongeveer meer dan 2 keer zoveel CCA als CAA. In sera van geïnfecteerde muizen werd 10 tot 100 keer zoveel CAA als CCA gedetecteerd en in urine precies het omgekeerde, wat aangeeft dat de opruimingsmechanismen van de twee antigenen erg verschillend zijn.

Dit proefschrift wordt met een korte algemene discussie in **hoofdstuk 12** afgesloten.