



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Advancing helminth glycomics: structural specificity and immunogenicity of schistosomal and filarial glycans

Petralia, L.M.C.

Citation

Petralia, L. M. C. (2025, April 16). *Advancing helminth glycomics: structural specificity and immunogenicity of schistosomal and filarial glycans*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4212211>

Version: 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/1887/4212211>

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

Nederlandse samenvatting

Achtergrond informatie

Infecties met helminthen (parasitaire wormen), komen vooral in ontwikkelingslanden veel voor, waar ze grote nadelige sociale en economische gevolgen voor de bevolking hebben. Tot de groep van helminthen die zogenoemde verwaarloosde tropische ziekten veroorzaken behoren onder anderen schistosomen en draadwormen (filaria) die het meest voor komen in Sub-Sahara Afrika, Zuid-Amerika en zuidelijk Azië. Schistosomiasis is een door watercontact veroorzaakte ziekte als gevolg van infectie met *Schistosoma* die in mensen voornamelijk wordt veroorzaakt door *S. haematobium* en *S. mansoni*. Met naar schatting meer dan 200 miljoen geïnfecteerde mensen wereldwijd staat schistosomiasis op de tweede plek, achter malaria, als de meest ernstige parasitaire ziekte. Filaria worden overgedragen via insecten (muggen en vliegen) en zijn de oorzaak van verschillende soorten filariasis in ongeveer 70 miljoen mensen. *Wuchereria bancrofti* en *Brugia* spp. veroorzaken lymfatische filariasis, ook wel elefantiasis genoemd, een ziekte die tot ernstige aandoeningen van het lymfesysteem kan leiden. *Onchocerca volvulus*, de veroorzaker van onchocerciasis (rivierblindheid) kan daarentegen leiden tot aandoeningen aan de huid en het zicht.

Helminthen zijn in staat om langere tijd (meer dan een decennium) in de gastheer (een zoogdier) te overleven. Om in die vijandige omgeving te kunnen overleven hebben deze parasieten mechanismen ontwikkeld om het immuunsysteem te omzeilen. Dit gebeurt via een aantal moleculaire trucs die de parasieten in staat stellen om de afweer reactie van de gastheer te dempen en te reguleren. Het is nog lang niet duidelijk welke moleculen en mechanismen hierbij betrokken zijn. Een beter begrip van de gastheer-parasiet biologie is echter noodzakelijk om deze ziekten te kunnen bestrijden en om de noodzakelijke (profylactische) therapieën en gevoelige detectie methodes te ontwikkelen.

Focus en doel van dit proefschrift

Glycanen zijn koolhydraatketens die meestal als verbinding met proteïnen en lipiden voorkomen op het oppervlak van cellen en in materiaal wat door cellen wordt uitgescheiden. Deze glycanen zijn betrokken bij een groot aantal biologische processen. Ze spelen met name in de communicatie tussen cellen en daarmee ook in de interactie tussen de gastheer en de parasiet een hele belangrijke rol. Daarom vormen glycanen mogelijke aangrijpingspunten voor diagnostiek en vaccins/medicijnen. De bestudering hiervan is echter op vele manieren achter

gebleven waardoor onze kennis van helminth glycanen nog steeds niet compleet is. Het werk in dit proefschrift moet deze kennis vergroten door de bestudering van **(1)** de structuur van de glycanen die schistosomen en draadwormen tot expressie brengen (**hoofdstukken 2-4**), **(2)** de antilichaam reactie tegen de glycanen van deze parasieten (**hoofdstukken 2-4**) en **(3)** het effect van een parasitaire infectie op de glycanen van de gastheer (**hoofdstuk 5**).

Beantwoorde vragen in dit proefschrift	Parasiet (species) Parasitaire ziekte (in gastheer indien van toepassing)	Studie type	Hoofdstuk
(1) Welke glycanen worden tot expressie gebracht door de parasiet?	<i>S. haematobium</i> & <i>S. mansoni</i> Schistosomiasis	Glycaan analyses met behulp van massa spectrometrie	2
	<i>B. malayi</i> Lymfatische filariasis		3
	<i>O. volvulus</i> Onchocerciasis		4
	<i>S. haematobium</i> & <i>S. mansoni</i> Schistosomiasis (in mensen)		2
(2) Worden er antilichamen opgewekt tegen glycanen van de parasiet in de geïnfecteerde gastheer?	<i>B. malayi</i> Lymfatische filariasis (in resusapen en mensen)	Glycaan microarray studie	3
	<i>B. malayi</i> , <i>L. loa</i> , <i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i> , <i>W. bancrofti</i> Filariasis (in mensen)		4
	<i>B. malayi</i> Lymfatische filariasis (in resusapen)		5
(3) Zorgt een parasitaire infectie voor verandering van de glycanen van de gastheer?		Massaspectrometrie-gebaseerde structurele glycaan analyses gecombineerd met UHLC profielen	

Studieoverzicht en bevindingen

Aan het begin van het huidige onderzoek, toen de kennis van glycanen van filaria nogal beperkt was, was voor *S. mansoni* al wel een aanzienlijke hoeveelheid data beschikbaar. Van *S. mansoni* is bekend dat deze parasiet complexe, sekse-specifieke en structureel unieke glycanen tot expressie brengt die immuunreacties kunnen opwekken (immunogeen) of kunnen reguleren (immuunmodulator). Ondanks duidelijke biologische verschillen (o.a. orgaan waar de wormen verblijven en de ziekte (pathologie) die ze veroorzaken), is er geen vergelijkbaar werk gedaan voor de veel voorkomende *S. haematobium* species. In **Hoofdstuk 2** zijn voor *S. haematobium* drie belangrijke klassen van glycanen – de aan eiwit gebonden *N*- en *O*-glycanen en de glycosfingolipide (GSL) glycanen – gekarakteriseerd met een op massaspectrometrie (MS) gebaseerd proces in combinatie met technieken waarbij de primaire glycaanstructuur (sequentie) bepaald wordt. Drie ontwikkelingsstadia van *S. haematobium*, die de levenscyclus van de parasiet vertegenwoordigen, zijn

onderzocht. De expressie van verschillende glycanen was stadium-specifiek en de glycaan structuren omvatten bepaalde eigenschappen die al voor *S. mansoni* beschreven zijn, naast enkele nieuwe structureigenschappen. Wanneer dezelfde levensstadia van beide species direct vergeleken werden, zijn opvallende variaties in de relatieve hoeveelheid van verschillende glycanen gevonden. De grootste verschillen zijn gevonden in de GSL glycanen die in *S. haematobium* een andere basisstructuur hebben dan die in *S. mansoni*. Bovendien zijn glucuronzuur (GlcA) bevattende GSL glycanen gekarakteriseerd in wormen en eieren van *S. haematobium* die nog niet eerder beschreven waren. Nader onderzoek liet zien dat zure GSL glycanen ook gedetecteerd konden worden in *S. mansoni* eieren, maar dat deze in grotere mate aanwezig zijn in de eieren van *S. haematobium*. Opvallende verschillen tussen de fucosyleringspatronen tussen de ei GSL glycanen van *S. haematobium* en *S. mansoni* zijn zichtbaar gemaakt met “Porous graphitized carbon nano-liquid chromatography” (PGC-nano-LC-MS/MS), een analyse methode met een zeer hoog scheidend vermogen. De beperkte hoeveelheid fucoses in *S. haematobium* eieren zijn gebonden in de nabijheid van de GSL glycaan kern structuur, terwijl *S. mansoni* GSL glycanen multi-gefucosyleerde motieven op het uiteinde hebben en zich vlak naast de sub-terminale GlcA in de zure structuren bevinden. Antilichaam reacties tegen *Schistosoma* glycanen in *S. haematobium* en *S. mansoni* infecties zijn bestudeerd met behulp van glycaan microarrays die een brede dekking van het glycaan repertoire van de parasiet hebben maar wel met een focus op de differentiële structuren. In sera van geïnfecteerde individuen zijn Immunoglobuline (Ig) G en IgM gevonden tegen een verscheidenheid aan glycanen waarvan vele immunogeen zijn in beide infectiegroepen. Multi-gefucosyleerde glycanen en ei GSL glycanen die de nieuw gevonden epitoom met GlcA bevatten, bleken erg antigeen te zijn. Wat interessant is, is dat de *S. haematobium* infectie sera meer IgG bevatten tegen de GLS glycanen met GlcA dan de *S. mansoni* infectie sera, wat aangeeft dat de gevonden structurele verschillen tussen deze soorten terug te zien zijn in de opgewekte IgG reactie in geïnfecteerde individuen. Deze species-specifieke glycobiologie zou mogelijk verder kunnen worden onderzocht voor diagnostische toepassingen om te helpen bij het onderscheid maken tussen *Schistosoma* soorten, en om *S. haematobium* te detecteren.

Het onderzoek naar glycanen van draadwormen in **hoofdstuk 3** is begonnen met de studie naar *N*- en GSL glycanen van *Brugia malayi*, een van de veroorzakers van lymfatische filariasis. Vele *B. malayi* glycanen (zowel *N*- als GSL- glycanen) bevatten de immuunmodulatoire component phosphorylcholine (PC). PC-bevattende *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residuen, zoals eerder beschreven voor andere draadwormen, werden veel gevonden en in de *N*-glycanen van *B. malayi* bleek PC ook aan mannose residuen gebonden te kunnen zijn. Andere veel voorkomende motieven in *B. malayi* glycanen zijn terminaal GlcA, gefucosyleerd HexNAc en (gefucosyleerd) α -gebonden galactose (α Gal). Uit analyses met microarrays van *B. malayi* glycanen bleek dat in de geïnfecteerde gastheer worden IgG en IgM aangemaakt tegen deze lichaamsvreemde glycaan motieven. Een deel van de anionische en zwitterionische GSL glycanen bleek heel erg antigeen in zowel *B. malayi* geïnfecteerde mensen als

resusapen. De resusapen maakten onderdeel uit van een I cohort waarbij de infectie met *B. malayi* in de tijd gevolgd is wat deze studie informatief maakt wat betreft het bestuderen van de dynamiek in de anti-glycaan antilichaam responsen in LF. IgM in serum kwam al vroeg op, maar nam weer af gedurende de infectie terwijl IgG geleidelijk toenam vanaf week 5 na infectie en vervolgens hoog bleef. Wat interessant is, is dat anti-glycaan IgG juist sterk omlaag ging na behandeling met anti-helminthica, iets wat veelbelovend zou kunnen zijn voor diagnostische toepassingen.

Wanneer antilichaam responsen vanuit een diagnostisch perspectief worden bekeken, is kruisreactiviteit met andere infecties een belangrijk aspect. Vanwege eerdere publicaties over gedeelde eigenschappen binnen de draadwormen familie, zijn in **hoofdstuk 4** de antilichaam reacties tegen *B. malayi* glycaan antigenen vergeleken tussen vijf belangrijke filaria infecties in mensen. Naast *B. malayi* infectie sera zijn de glycaan microarrays ook gebruikt voor de analyse van anti-glycaan antilichamen in sera van individuen die geïnfecteerd zijn met *O. volvulus*, *Mansonella perstans*, *Loa loa* en *Wuchereria bancrofti*. Binding van IgG aan een subset van terminaal αGal en PC-houdende GSL glycanen is gevonden voor alle infectiesera, iets wat aangeeft dat blootstelling aan deze glycaan elementen in alle vijf filaria infecties plaatsvindt. Individuen die geïnfecteerd zijn met *B. malayi*, *O. volvulus* of *M. perstans* lieten erg op elkaar lijkende IgG responsen zien met een bindingsprofiel aan nog vele andere *B. malayi* glycanen dat anders is dan die in niet-endemische controle sera en *L. loa* of *W. bancrofti* infectie sera. Glycaan analyses van *O. volvulus*, die in dit hoofdstuk zijn uitgevoerd, kunnen in grote mate de duidelijke IgG kruisreactiviteit met *B. malayi* infecties verklaren, aangezien beide species vergelijkbare N-gebonden en GSL glycanen tot expressie brengen. Vanwege de variabele eigenschappen van specifieke IgG subklassen en daarmee hun potentieel in diagnostische toepassingen is een glycaan microarray uitgevoerd om de rol van de IgG subklassen en hun aandeel in de sterke IgG respons in *B. malayi*, *O. volvulus* en *M. perstans* infecties te bestuderen. De belangrijkste subklassen in de glycaan herkenning door IgG zijn IgG1 en IgG2. Wat hierbij nog van belang is, is dat IgG2 de subklasse is die de sterkste reductie liet zien in alle *B. malayi* geïnfecteerde individuen na behandeling met anthelminthicum. De bevindingen in dit hoofdstuk laten de complexiteit van anti-glycaan antilichaam reacties in infecties met draadwormen zien en onderscheiden de breed kruis-reactieve *B. malayi* glycaan motieven van de infectie-specifieke kenmerken die diagnostische potentieel hebben.

Een mogelijk bijkomstig resultaat van infectieziekten is een afwijkende glycosylering van de gastheer, iets wat veroorzaakt wordt door een ontregeling van activiteit van glycosyltransferases en glycosidases door de pathogeen in bepaalde cellen of organen. Aangezien de meeste eiwitten in serum van zoogdieren geglycosyleerd zijn, is het serum het gekozen medium om dergelijke veranderingen te zien en te bepalen. In **hoofdstuk 5** bood het longitudinale cohort van resusapen sera de mogelijkheid om dit in filariasis te onderzoeken. De serum en IgG N-glycanen van niet-geïnfecteerde resusapen zijn gekarakteriseerd door gebruik te maken van een gevalideerde hydrofiele interactie chromatografie techniek (HILIC-UPLC) in combinatie

met massa spectrometrie. Naast het uitbreiden van de huidige kennis over glycanen in een belangrijk diermodel bood dit ook de mogelijkheid om veranderingen als gevolg van *B. malayi* infectie te volgen met behulp van HILIC-UPLC. Vroeg na de infectie, nog voor de microfilaremie, werden veranderingen in vele verschillende serum *N*-glycanen gezien. De meeste veranderingen waren in één richting; specifieke *N*-glycanen waren ofwel toegenomen of afgenomen als gevolg van de infectie en fluctueerden niet. Dit resulteerde in een algehele afname van sialylering van *N*-glycanen gepaard gaande met verhoogde galactosylering en mannosylering. Wat interessant is, is dat deze bevindingen niet gelijk waren aan die eerder gemaakt zijn in sera van honden die geïnfecteerd waren met de draadworm *Dirofilaria immitis*. Dit suggereert dat de getoonde veranderingen infectie- of gastheer-specifiek kunnen zijn en laat de sterke invloed van parasitaire infectie op de glycobiologie van de gastheer zien. Complementair onderzoek waarbij gebruik gemaakt wordt van glycoproteomics om de glycoproteïne expressie en de glycosylerings posities op het geglycosyleerde eiwit die bijdragen aan de geobserveerde serum *N*-glycanen te identificeren, kan in de toekomst bijdragen aan klinische biomarkers voor infectie.

Conclusie

Het werk dat in dit proefschrift is gepresenteerd, heeft significant bijgedragen aan de kennis van verschillende aspecten van glycanen in schistosomiasis en filariasis. Door glycaan structuren te definiëren die tot voor kort nog niet beschreven waren, hebben de huidige studies onze kennis over de structuur en functie van helminth glycanen substantieel uitgebreid. Dit onderzoek geeft ook inzicht in de antilichaam reactie van de gastheer tegen deze glycanen en de door infectie-geïnduceerde veranderingen in de *N*-glycosylering van het serum. Dit omvat waardevolle informatie om de huidige uitdagingen op het gebied van belangrijke parasitaire ziekten, zoals schistosomiasis en filariasis, aan te kunnen pakken.