

## **Functional analysis of immunogenic glycoconjugates in the pathogenesis of schistosomiasis**

Koen Van de Vijver

Promotores: Prof. dr. E van der Marck; Prof. dr. A Deelder

Co-promotores: Dr. C Hokke; Prof. Dr. W. Jacobs

Faculteit Geneeskunde, Universiteit Antwerpen

### **Summary**

Schistosomiasis is a serious global helminthic disease, infecting man, wildlife and livestock. Recent estimates suggest more than 700 million people are at risk of exposure, with almost 200 million infected in Africa, Asia and South America. In importance, the World Health Organisation ranks schistosomiasis next to malaria as a Category II disease (Chapter 1). The balance between host and infectious agents tends towards a state of mutual survival. However, a mature, patent schistosome infection is associated with severe chronic tissue inflammation, causing irreversible damage to the host's liver, kidneys or urinary tract. Upon infection, the schistosome parasite resides in the host's blood vessels, where they live up to 5 years and more, producing hundreds of eggs per day. The main immunopathology during infection consists of a granulomatous and fibrosing reaction against tissue-trapped parasite eggs. Much of the host-schistosome interaction depends on parasite glycoconjugates. In this thesis, parasite glycans involved in the immune response, and more precisely in granuloma formation, are studied.

Chapter 2 provides a general introduction to schistosomiasis and its complex life cycle. To survive, schistosomes developed many strategies to evade and skew the host's immune response, including molecular mimicry, antigenic variation, disguising antigen processing and presentation and immune exploitation. A general overview of glycoconjugates and more specific of schistosome glycobiology is given. Th1 and Th2 immune responses during the course of infection are reviewed, highlighting the functional and immunological aspects of characteristic schistosome glycans. Lewis<sup>X</sup> (Le<sup>X</sup>), LacdiNAc

(LDN) and their fucosylated variants play an essential role in innate and adaptive immunity. In addition to the Th1 and Th2 paradigm, the importance of activated macrophages and dendritic cells in polarising the immune system is discussed.

Chapter 3 focuses on the presentation of Le<sup>X</sup> to the immune system. In a time course experiment, the levels of antibodies against oligomeric and polymeric Le<sup>X</sup> have been measured in sera of mice with a schistosome infection using surface plasmon resonance. A striking difference in antibody response intensity against monomeric Le<sup>X</sup> versus di- and trimeric Le<sup>X</sup> was observed. The anti-CCA response, representing an anti-multimeric Le<sup>X</sup> response, was delayed and more prolonged compared to the oligomeric Le<sup>X</sup> responses. These results indicate that the same glycan presented in different forms, *i.e.* in monomeric, dimeric or multimeric state, elicits different humoral reactions. The position of the antigenic element in the whole glycan structure, *i.e.* terminal Le<sup>X</sup>, a terminal Le<sup>X</sup> linked to an internal Le<sup>X</sup> or multimeric internal Le<sup>X</sup>, is also of great importance. Our hypothesis was further supported by the observation that a panel of monoclonal antibodies, all recognising Le<sup>X</sup>, could be divided into three groups according to their binding pattern and interaction with the different oligo- and polymeric Le<sup>X</sup> oligosaccharides. As the humoral immune system can distinguish between different meric forms of Le<sup>X</sup>, probably also the cellular immune responses are triggered in different ways, explaining the differences observed *in vivo*. In future studies examining Le<sup>X</sup>-induced immune responses, not only the discrimination between oligo- and polymeric Le<sup>X</sup> should be considered, but also the discrimination between the multivalency of Le<sup>X</sup>, *i.e.* free versus conjugated to a carrier molecule.

Using a standardised *in vivo* bead-model of synchronised hepatic granulomatous inflammation, the granulomogenic properties of schistosome glycans, schistosome-related neoglycoconjugates and glycoproteins bearing schistosomal cross-reactive epitopes are investigated. In Chapter 4, it has been determined that the glycan moiety of schistosomal soluble egg antigens (SEA) and of keyhole limpet haemocyanin (KLH) initiates granuloma formation. The major schistosome epitopes in the SEA/KLH cross-reactivity have recently been described as F-LDN and F-LDN-F, however many other immunogenic glycans are present on KLH. Immunophenotyping of the experimentally glycan-induced granulomas

for cellular recruitment, chemokines, adhesion molecules and extracellular matrix proteins, revealed very close resemblance with the hepatic lesions evoked by genuine schistosome eggs. To identify the particular carbohydrate elements that are responsible for the granulomogenic activity of SEA, various synthetic oligosaccharides were tested in the same mouse model, as described in Chapter 5. Among the tested glycans, including LDN, Le<sup>x</sup>, GlcNAc (Gn), F-Gn, DF-Gn, LDN-F and F-LDN-F, and the appropriate controls, including fetuin, asialofetuin, agalactoasialofetuin, ribonuclease A and B and BSA, granulomogenic activity was restricted to glycoconjugates that bear terminal LDN or LN (as present in asialofetuin). Galactose-containing glycans are recognised by host lectins, such as the hepatic asialoglycoprotein receptor, the macrophage galactose-type receptor, DC-SIGN or galectins. Immunohistochemical staining demonstrated the presence of galectin-3, which strongly binds to LDN, in the activated macrophages of the granulomas around coated beads and around native schistosome eggs. The possible role of galectins and other lectins in initiating and mediating granuloma formation and subsequent fibrosis, needs further investigation, which is discussed in the General Discussion of this thesis (Chapter 7).

The concomitant occurrence of chronic inflammation and angiogenesis is a well-known feature of many diseases. Recently, it was found that SEA contains a pro-angiogenic factor. In Chapter 6, the angiogenic properties of SEA were considered in different mouse strains, after infection with different *Schistosoma spp.*, and in the bead-model. To this end, ongoing angiogenesis was determined with a double immunohistochemical staining protocol using anti-CD34 and anti-Ki67 antibodies. Angiogenesis occurs both in *S. mansoni*- and in *S. haematobium*-induced granulomas, indicating that the pro-angiogenic factor is not species-specific, but related to the genus *Schistosoma*. Granulomas induced by SEA-coated beads also showed neovascularisation, however no blood vessels were observed in the LDN- or LN-induced granulomas, suggesting that the active component is not a plain carbohydrate structure. A striking difference was noticed between different mouse strains. In the low-pathology BL6 mice, the portal stroma around the granulomas was preserved in 91%, showing no or minimal angiogenesis, whereas in the high-pathology C3H mice, 87% of the granulomas were of the angiogenic type with destruction of the pre-existing stroma. This indicates a role of

host's genetic mechanisms regulating the degree of angiogenesis, the size of granulomas and the amount of fibrosis, and thus determining the severity of schistosome-induced pathology. Unravelling the immunological and extrimmunological mechanisms, together with a better knowledge of the schistosome (glyco)biology, will enable the development of novel diagnostic and therapeutic tools, for the improvement of human and animal health.

## Samenvatting

Schistosomiasis is wereldwijd een ernstige parasitaire infectieziekte voor de mens, voor de veestapel en voor wilde dieren. Recente schattingen suggereren dat meer dan 700 miljoen mensen het risico lopen om besmet te worden, waarbij er in Afrika, Azië en Zuid-Amerika nu reeds bijna 200 miljoen effectief de ziekte hebben. Hierdoor plaatst de Wereldgezondheidsorganisatie schistosomiasis naast malaria bij de Categorie II aandoeningen (Hoofdstuk 1). Het evenwicht tussen gastheer en infectieus agens neigt naar een toestand van wederzijdse overleving. Besmetting met schistosomiasis is echter gerelateerd aan ernstige chronische weefselontsteking, met onherroepelijke beschadiging van de organen van de gastheer, zoals de lever, nieren en de urinewegen. Na infectie verblijven de schistosomen in de bloedvaten van de gastheer, waar ze tot 5 jaar en langer kunnen overleven. Ondertussen produceren ze honderden eieren per dag, die door de bloedstroom meegesleurd worden naar de verschillende organen en daar blijven vastzitten. De meest ernstige pathologische problemen worden veroorzaakt door een granulomateuze en fibroserende ontstekingsreactie tegen deze geëmboliseerde eieren. Een belangrijke rol in de interactie tussen gastheer en parasiet blijkt te zijn weggelegd voor de glycoconjugaten, of glycanen (geglycosyleerde eiwitten en lipiden). In dit proefschrift werden de glycanen onderzocht die betrokken zijn bij de immuunrespons, en meer in het bijzonder bij de granuloomvorming.

Hoofdstuk 2 geeft een algemene inleiding over schistosomiasis en de complexe levenscyclus van deze parasiet. Om te overleven heeft de *Schistosoma* worm allerlei strategieën ontwikkeld om het afweersysteem van de gastheer te ontwijken en te sturen, zoals moleculaire nabootsing (mimicry), antigene variatie, vermommen van antigeenverwerking en -presentatie en het actief misbruiken van afweerproducten van de gastheer. Een samenvatting over glycoconjugaten in het algemeen en over schistosomale glycobiologie in het bijzonder wordt weergegeven. De Th1 en Th2 immuunrespons tijdens het verloop van een infectie is beschreven, waarbij de functionele en immunologische aspecten van bepaalde schistosomale glycanen aan bod komen. Ondermeer Lewis<sup>X</sup> (Le<sup>X</sup>), LacdiNAc (LDN) en gefucosyleerde varianten spelen een belangrijke rol in de aangeboren

en verworven immuniteit. Tenslotte wordt ook het belang van macrofagen en dendritische cellen in het polariseren van het immuunsysteem belicht.

Hoofdstuk 3 behandelt de presentatie van  $Le^X$  aan het immuunsysteem. In een tijdsgerelateerd onderzoek wordt met behulp van “surface plasmon resonance” de titer gemeten van antilichamen gericht tegen oligomere en polymere  $Le^X$  varianten in met schistosomiasis besmette muizensera. Een opvallend intensiteitverschil in antilichaamproductie werd gezien tussen monomeer  $Le^X$  tegenover di- en trimeer  $Le^X$ . Het immuunantwoord tegen CCA (dat het immunogene polymeer  $Le^X$  bevat) komt later en is meer uitgesproken dan dat van oligomeer  $Le^X$ . Dit toont aan dat eenzelfde glycaan, aangeboden aan het immuunsysteem onder verschillende vormen, *i.e.* als monomeer, dimeer, trimeer of multimeer, een verschillend humoraal antwoord opwekt. De plaats van het antigene element ten opzichte van de gehele glycaanstructuur, hetzij als terminaal  $Le^X$ , hetzij als terminaal  $Le^X$  dat gekoppeld is aan een intern geplaatst  $Le^X$ , hetzij als een multimeer intern geplaatst  $Le^X$ , speelt ook een grote rol. Deze hypothese wordt verder ondersteund door het feit dat een groep monoclonale antilichamen die allemaal  $Le^X$  herkennen, in drie verschillende groepen kunnen opgedeeld worden volgens hun bindingspatroon en interactie met de verschillende oligomere en polymere  $Le^X$  oligosacchariden. Net zoals het humorale afweersysteem een onderscheid kan maken tussen de verschillende  $Le^X$  vormen, zal dit hoogstwaarschijnlijk ook gelden voor de cellulaire afweerreactie, wat een mogelijke verklaring kan zijn voor *in vivo* waargenomen verschillen. Verder wordt geconcludeerd dat toekomstige experimenten die de  $Le^X$ -geïnduceerde immuunrespons willen bestuderen, niet alleen rekening moeten houden met het onderscheid tussen oligomeer en polymeer  $Le^X$ , maar ook met het verschil tussen vrij  $Le^X$  en  $Le^X$  geconjugeerd aan een dragermolecule (*i.e.* de multivalentie van  $Le^X$ ).

Gebruikmakend van een gestandaardiseerd *in vivo* model, waarbij door middel van kleine antigeen-beladen partikels gesynchroniseerde granuloomvorming in de lever wordt nagebootst, werden de granulomogene eigenschappen onderzocht van verscheidene schistosomale glycanen, schistosoom-gerelateerde neoglycoconjugaten en glycoproteïnen die met *Schistosoma*-kruisreagerende epitopen bevatten. In Hoofdstuk 4 wordt beschreven dat de glycaancomponent (in tegenstelling tot de eiwitcomponent) van ei-antigenen (SEA)

en van het “keyhole limpet haemocyanine” (KLH) granuloomvorming initieert. De belangrijkste kruisreactieve epitopen tussen SEA en KLH werden recent beschreven als F-LDN en F-LDN-F, hoewel KLH nog vele andere immunogene glycanen bevat. Immunofenotypering van de experimenteel geïnduceerde granulomen, op basis van het aantal en de aard van ontstekingscellen, chemokines, adhesiemoleculen en extracellulaire matrix eiwitten in de granulomen, toonde duidelijk aan dat de glycaan-geïnduceerde granulomen in zeer grote mate gelijk zijn aan de granulomen opgewekt door echte *Schistosoma mansoni* eieren. Om de specifieke koolhydraatelementen, verantwoordelijk voor de granulomogene eigenschappen van SEA, verder te identificeren, werden verscheidene synthetische oligosacchariden uitgetest in hetzelfde onderzoeksmodel. Dit wordt beschreven in Hoofdstuk 5. Er werd gebruik gemaakt van de neoglycoconjugaten LDN, Le<sup>X</sup>, GlcNAc (Gn), F-Gn, DF-Gn, LDN-F en F-LDN-F, en van enkele controle-glycoproteïnen, waaronder fetuïne, asialofetuïne, agalactoasialofetuïne, ribonuclease A and B en BSA. Enkel de glycoproteïnen met een terminaal gepositioneerd LDN of LN (zoals in asialofetuïne) initieerden granuloomvorming. Glycanen die een terminaal galactose bevatten, zoals LDN en LN, worden door het immuunsysteem herkend door specifieke lectines. Tot de groep van lectines behoren onder andere de hepatische asialoglycoproteïne receptor, de macrofaag-galactose-receptor, DC-SIGN en de galectines. Immunohistochemisch werd de aanwezigheid van galectine-3, waarvan bekend is dat het sterk bindt aan LDN, aangetoond in geactiveerde macrofagen van de granulomen rond de glycaan-beladen partikels en rond echte schistosoommeieren. De mogelijke rol van galectines en van andere lectines in het initiëren en onderhouden van de granulomogenese en fibrogenese vergt nog verder onderzoek, zoals besproken in de Algemene Discussie (Hoofdstuk 7).

Het tegelijkertijd voorkomen van chronische ontsteking en angiogenese is een goed gekend fenomeen bij talrijke aandoeningen. Onlangs werd beschreven dat SEA pro-angiogene eigenschappen bezit. In Hoofdstuk 6 worden deze angiogene eigenschappen van SEA bestudeerd in verschillende muizenstammen, na besmetting door verschillende *Schistosoma spp.* en in het bovenbeschreven partikel-model. Actieve angiogenese werd bepaald door middel van een immunohistochemische dubbelkleuring, waar gebruik gemaakt wordt van antilichamen gericht tegen CD34 en tegen Ki67. De studie toonde aan

dat angiogenese zowel voorkomt in granulomen geïnduceerd door *S. mansoni* als door *S. haematobium*. De pro-angiogene factor is dus zeker niet species-specifiek, maar mogelijk gerelateerd aan het genus *Schistosoma*. Nieuwvorming van bloedvaten werd wel waargenomen in de granulomen geïnduceerd door met SEA-beladen partikels, doch niet in de door LDN- of LN-geïnduceerde granulomen, wat doet vermoeden dat de actieve angiogene factor geen pure koolhydraatstructuur is. Een opvallend onderscheid werd gezien tussen BL6 muizen die een lichte pathologie vertonen na infectie en C3H muizen die een veel ernstigere pathologie vertonen. 91% van de granulomen van BL6 muizen vertoonden geen tot weinig angiogenese, met behoud van het preëxistente stroma van de portavelden, waarbij 87% van de granulomen van C3H muizen wel angiogenese vertoonden, met vernietiging van het portale stroma. Deze laatste granulomen waren significant groter en bevatten meer fibrose. De intrinsiek genetische mechanismen van de gastheer spelen dus een mogelijke rol in de granuloomvorming, de graad van angiogenese, het fibrosieren van de granulomen en aldus in de ernst van de *Schistosoma*-gerelateerde pathologie. Het ophelderen van de immunologische en extra-immunologische mechanismen, gekoppeld aan een betere kennis van de schistosomale (glyco)biologie, zal ons hopelijk in staat stellen om nieuwe, effectieve diagnostische en therapeutische middelen te ontwikkelen, ter verbetering van de gezondheid van mens en dier.