

Targeted identification of *Schistosoma mansoni* egg glycans

Thesis by: **Marjolein Robijn**

Promotor: Prof. dr. A.M. Deelder

Co-promotor: Dr. C.H. Hokke

Leiden University Medical Centre (LUMC),
Leiden, the Netherlands

Date: 20 February 2008

Summary and Samenvatting (Dutch)

SUMMARY

Schistosomiasis, also known as bilharzia, is a disease that still occurs in many parts of Africa, the Middle East and Southern America, mainly Brasil and the Caribbean. Schistosomiasis is, after malaria, the second most common parasitic infection. Currently 200 million people are infected with the worms that cause the disease. *Schistosoma mansoni* is the most common schistosome species that infects humans.

S. mansoni uses freshwater snails of the species *Biomphalaria* as an intermediate host. In the snails asexual reproduction occurs and cercariae (larvae with a bifurcated tail) develop. When the cercariae emerge they propel through the water actively seeking for their final host. Upon contact with the human host the cercariae penetrate the skin. The parasite then migrates, via the circulation through the lungs and the hepatportal circulation where they pair and develop into adult worms, before migrating to the mesenteric veins. The adult female worm, which is cylindrical, thinner and longer than the male, resides within the gynaecophoric canal of the adult male worm (measuring 1 to 2 cm long). The canal is a modification of the ventral surface of the male and forms a groove. The female worm lays hundreds of eggs (around 300) a day. It is assumed that approximately half of the eggs migrate through the wall of the

intestine and are excreted in the faeces. Upon contact with fresh water, ciliated miracidia hatch from the excreted eggs and may then infect the intermediate snail host to complete the lifecycle. The other half of the eggs is taken by the blood flow and becomes lodged in the liver or intestines, where a plethora of excreted egg antigens induce strong granulomatous inflammatory responses. These inflammatory responses around the trapped eggs are the main causes of the chronic symptoms of the disease. Effective treatment exists, but in endemic areas people often get re-infected. No vaccine against schistosomiasis is currently available.

The schistosome produces many different sugar structures (glycans) that are not made by humans. Central to this thesis are sugar structures with a “double fucose” (fucose is a monosaccharide like glucose). Such fucosylated glycans are mainly produced by the eggs, which play a major role in the disease of schistosomiasis, mainly produce the fucosylated glycans. The human immune defence system responds to these parasite specific structures in several ways. High antibody responses have been measured against sugar structures with a “double fucose” moiety and moreover different types of immune cells are known to interact with these glycan structures. Despite these immunological responses the human host is not able to clear the parasitic infection. The adult worms survive for many years (up to 35 years) in the host’s circulation. The glycans are thought to play a role in the mechanisms that *S. mansoni* has developed to survive in the hostile environment of the human blood. In this thesis the structures of several glycans containing the “double fucose” moiety have been characterised using different mass spectrometric techniques.

Chapter 1 is a general introduction on schistosomiasis and describes the different species of *Schistosoma*, the parasite’s life cycle (figure 1), the symptoms of the disease, diagnostic methods and current and potential intervention methods. The second part of the introduction contains information on schistosome glycoconjugates and their interactions with the human host. In addition, techniques used to study glycans or glycoconjugates are discussed.

The research described in this thesis is based on the results of previous research performed in our group, in which a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies (mAbs) was developed to measure specific *S. mansoni* egg glycoconjugates. The major part of this thesis concerns the identification and characterisation of the glycan structures that are recognised by one of these monoclonal antibodies, named mAb 114-4D12. In addition, the potential of these glycans for the development of new diagnostic methods is discussed.

Chapter 2 describes the mapping of fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of different life cycle stages of *S. mansoni*. Glycoprotein and glycolipid extracts from cercariae, adult worms and eggs were separated by SDS-PAGE and HP-TLC respectively, and were

subsequently stained with a monoclonal antibody, which was known to recognise fucosylated glycans. Six different monoclonal antibodies, all recognising different fucosylated glycan epitopes were used in this study. Information was obtained about the type of carrier (protein or lipid) and in which life cycle stage these fucosylated glycan epitopes were expressed. The study showed that fucosylated glycans were most extensively expressed on egg glycoproteins.

In **chapter 3** the glycan epitope and the epitope containing glycan structures that are recognised by mAb 114-4D12, were identified. The 114-4D12 epitope containing glycans were isolated from *S. mansoni* SEA (soluble egg antigens) using an efficient 114-4D12 affinity purification method. The affinity purified fraction of SEA (SEA-4D12) contained predominantly O-glycans that were released from their protein backbones by two different chemical glycan-releasing methods namely hydrazinolysis and beta-elimination, to allow detailed analysis of the released glycans. Subsequently the acquired glycans were analysed using different mass spectrometric methods (MALDI-TOF MS and LC-MS) and additional glycan characterisation techniques such as 'linkage analysis'. The SEA-4D12-glycans were shown to be significantly richer in fucose compared to the glycans released from 'normal SEA'.

For reasons not yet understood a high degree of degradation occurred during the hydrazinolysis procedure, which resulted in the release of smaller, linear glycan structures with a galactose at the reducing end. These glycans released by hydrazinolysis were subsequently labelled with the fluorescent 2AB-label to facilitate efficient purification and sensitive detection. The 2AB-labelled glycans obtained by hydrazinolysis proved very useful for determining the exact mAb 114-4D12 glycan epitope. The pool of 2AB-labelled glycans was subjected to 114-4D12 affinity chromatography and only the epitope-containing glycan structures ($H_1N_2F_4$ and $H_1N_3F_6$) were captured on the 114-4D12 column and as a result were clearly separated from all other glycans. By doing this, the minimal glycan epitope of mAb 114-4D12 was identified as $Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3GalNAc\beta 1-4(Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3)GlcNAc\beta 1-$. This epitope occurs predominantly on branched O-glycans based on a $GlcNAc\beta 1-6(Gal\beta 1-3)GalNAc-$ type 2 'core-structure' with compositions $H_1N_{3-8}F_{4-12}$.

From the above described study it appeared that mAb 114-4D12 has unique abilities to bind a monovalently presented glycan epitope. We therefore decided to perform 114-4D12 affinity purification on a urine-pool from *S. mansoni* infected individuals and to study the elution fraction for epitope containing structures using MALDI-TOF MS. The result of this test was described in **chapter 4**. To our surprise a sharp and characteristic MALDI-TOF MS peak pattern was generated, of which the putative compositions suggested that a series of free

glycans composed of one hexose (H), three to seven N-acetylhexosamines (N) and four to ten fucoses (F) ($H_1N_{3-7}F_{4-10}$) was captured. The reducing glycans were then 2AB-labelled, purified and further analysed by LC-MS. The question whether these glycans derived from the parasite could be answered by incubating *S. mansoni* worms and eggs in cell culture medium. The worm- and egg-supernatants were subsequently 114-4D12 affinity-purified in a similar way as the *S. mansoni* infection urine-pool. The 114-4D12-eluate of the *S. mansoni* egg-supernatant contained highly fucosylated free glycans while the 114-4D12 worm-eluate contained no peaks, and thus no free fucosylated glycans. The series of free glycans that were excreted by the eggs contained similar peaks to those visible in the 114-4D12 affinity-purified urine fraction and in addition contained a series of fucosylated glycans with composition: $N_{4-6}F_{4-10}$.

To our knowledge this is the first time that parasite eggs have been described to produce and excrete free glycans. At present, we neither know the synthesis route of these free glycans, nor whether in addition to the 114-4D12 recognised series of free glycans other glycans without or with less fucoses are produced.

In chapter 4 we described the technique for 114-4D12 affinity purification of *S. mansoni* egg-derived free glycans from a pool of urine samples from *S. mansoni* infected individuals. In **chapter 5** we investigated the possibilities of using these molecules as markers for infection for individual urine samples. An initial test was performed on 11 urine samples (1ml) from *S. mansoni* infected Senegalese individuals with variable intensity of infection. A specific MALDI-TOF MS peak pattern was obtained from nine out of the eleven infection urines. The described method was relatively labour intensive, which unfortunately did not allow us at that stage to test a much larger set of infection urines.

As the free glycans are excreted by the eggs, these structures could be seen as ‘egg-load’ related infection markers. As granuloma formation around the trapped eggs in liver or gut is the main cause of pathology the glycans are potential morbidity markers. To date there is still a need for a sensitive and highly specific method to diagnose people with light to moderate *Schistosoma* infections. Regularly travellers return home infected with schistosomiasis and infection intensity from the endemic population decreases due to expanded treatment programmes. For these reasons it would be worthwhile developing a (novel) sensitive and highly specific diagnostic method based on the detection of these free egg glycans. The method should also be less labour intensive in order to allow large sets of urines to be tested.

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) is a glycoprotein from the mollusc *Megathura crenulata* that shares a glycan motif with *Schistosoma mansoni*. Based on this similarity KLH can be

used for serodiagnosis purposes, by demonstrating the presence of cross-reactive antibodies in serum of *S. mansoni* infected patients. The immunogenic KLH glycans can, similarly to *S. mansoni* glycans induce granulomata. Moreover KLH has found several biomedical applications as immunogenic agent. In chapter 2 we demonstrated that the KLH / *S. mansoni* cross-reactive glycan epitope is terminal F-LDN-F, and that this glycan motif occurs on egg excreted glycoproteins and on glycolipids in parenchymal “spots or ducts” in adult worms. **Chapter 6** describes the characterisation of the KLH N-glycans and the identification of a new ‘core’-modification: (Gal β 1-4) \pm Gal β 1-4Fuc α 1- units (α 1-6)-linked to the reducing end N-acetylglucosamine residue. This glycan modification does not occur on *S. mansoni* N-glycans, but is expected to be immunogenic, like other non-mammalian-type ‘core’-modifications.

The closing chapter of this thesis contains a general discussion, **chapter 7**, which places the individual chapters into context and describes several aspects of our studies that were not yet described in one of the other chapters. The related diagnostic monoclonal antibodies 114-4D12 and 114-5B1 are mutually compared and the epitope characterisation method based on natural glycans for 114-4D12 (as described in this thesis) is compared to the epitope characterisation methods based on synthetic glycan epitopes as previously employed for mAb 114-5B1. In addition the results of preliminary proteomics analysis of the 114-4D12 affinity purified glycoproteins are presented. Finally, future prospects are discussed.

SAMENVATTING

De ziekte schistosomiasis, ook bekend als bilharzia, komt nog steeds in grote delen van de wereld voor. Na malaria is het de meest voorkomende parasitaire infectieziekte, momenteel zijn ruim 200 miljoen mensen besmet. Er zijn verschillende soorten *Schistosoma* die de mens als eindgastheer hebben, waarvan *Schistosoma mansoni* de meest voorkomende is. *S. mansoni* komt voor in grote delen van Afrika, het midden oosten en Zuid Amerika, met name in Brazilië en de Caraïben.

Slakken van het geslacht *Biomphalaria* die voorkomen in stilstaand zoet water worden door *S. mansoni* als tussengastheer gebruikt. Nadat de larven zich in de slak hebben vermenigvuldigd en ontwikkeld, komen vrijzwemmende cercariae met een gevorkte staart vrij. Mensen raken besmet wanneer zij in contact komen met water waarin cercariae leven. De cercariae dringen binnen een paar seconden de huid binnen en ontwikkelen zich in de aderen tot volwassen wormen. *S. mansoni* wormen leven in de poortaderen bij de lever. De mannetjes en vrouwtjes leven gepaard, het kortere (1 tot 2 cm) en plattere mannetje krult zich als het ware in de lengte

om het langere, dunnere en ronde vrouwtje. Het vrouwtje legt honderden (circa 300) eitjes per dag. Ongeveer de helft van de eitjes verlaat het lichaam via de ontlasting. Als de eitjes in contact komen met zoet water barsten de eitjes open en komt het miracidium naar buiten dat zich met behulp van trilharen op het oppervlak voortbeweegt. Als het miracidium een slak infecteert is de levenscyclus volledig. De eitjes die het lichaam niet met de ontlasting verlaten, worden meegevoerd door de bloedstroom en komen terecht in lever of darmen waar zij ontstekingen veroorzaken. Deze ontstekingen rond de “verdwaalde” eitjes zijn de belangrijkste veroorzakers van de symptomen van de ziekte. Er is een effectief medicijn, maar in endemische gebieden raken mensen na behandeling meestal snel opnieuw besmet. Er is geen vaccin beschikbaar.

De parasiet produceert veel verschillende suikerstructuren (glycanen) die niet door mensen worden gemaakt. In dit proefschrift spelen suikerstructuren met een “dubbele fucose” (fucose is een monosacharide, net als glucose) een centrale rol. In het bijzonder de eieren, die bij de ziekte schistosomiasis een belangrijke rol spelen, produceren veel van deze gefucosyleerde suikerstructuren. Het menselijke afweersysteem reageert op deze vreemde structuren: er zijn hoge antilichaamresponsen gemeten tegen deze “dubbele fucose” en ook worden deze structuren herkend door verschillende typen afweercellen. Ondanks de immunologische reacties tegen deze en andere parasitaire componenten is het lichaam toch niet in staat de parasiet op te ruimen: de volwassen *Schistosoma*-wormen kunnen tot tientallen jaren in de bloedbaan van de mens overleven. Mogelijk spelen juist glycanen een rol bij de ontsappingsmechanismen die *S. mansoni* heeft ontwikkeld om zo lang mogelijk in “harmonie” met zijn gastheer te kunnen leven. In dit proefschrift is de structuur van verschillende glycanen met de “dubbele fucose” met behulp van massa-spectrometrie gekarakteriseerd.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over schistosomiasis: de verschillende soorten *Schistosoma*, de levenscyclus van de parasiet (figuur 1), de ziekteverschijnselen, methoden voor diagnostiek en de huidige en toekomstige bestrijdingsmethoden. Het tweede gedeelte van de inleiding behandelt de glycoconjugaten (glycanen zijn meestal gebonden aan een drager zoals eiwitten of lipiden) die schistosomen produceren en de mogelijke rol die zij spelen bij de interactie tussen de parasiet en zijn gastheer. Vervolgens worden de technieken besproken die kunnen worden gebruikt om glycanen of glycoconjugaten te analyseren.

Dit onderzoek is gebaseerd op de resultaten van eerder onderzoek in Leiden waarbij, met behulp van twee monoklonale antilichamen (mAbs), specifieke glycoconjugaten uit *S.*

mansoni eieren met een sandwich ELISA in serum of urine van patiënten konden worden aangetoond. Het grootste deel van dit proefschrift beschrijft in detail welke glycanen een van deze twee antilichamen, mAb 114-4D12, herkent en op welke manier deze kunnen worden gebruikt voor het ontwikkelen van een nieuwe, potentieel gevoeliger diagnostische methode.

In **hoofdstuk 2** worden allereerst de antigenen in kaart gebracht die worden herkend door zes andere antilichamen waarvan we weten dat deze ook allemaal glycanen met een fucose herkennen. De glycoproteïnen en glycolipiden van drie verschillende stadia van de parasiet (cercariën, volwassen wormen en eieren) zijn gescheiden, met behulp van respectievelijk SDS-PAGE en HP-TLC en vervolgens aangekleurd met de monoklonale antilichamen. Op deze manier is informatie verkregen over in welk stadium en op welke drager (eiwit of lipide) de verschillende glycanen tot expressie komen. Met name de eiwitten van het ei bleken zeer rijk aan gefucosyleerde glycanen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de identificatie van de glyco-epitop die wordt herkend door mAb 114-4D12 en de onderliggende glycanen. Uit *S. mansoni* SEA (soluble egg antigens/oplosbare ei-antigenen) worden de 114-4D12-epitop bevattende ei-antigenen (SEA-4D12) geïsoleerd met behulp van een efficiënte 114-4D12-affiniteitszuiveringmethode. SEA-4D12 bevat voornamelijk O-glycanen die zijn afgesplitst met behulp van twee verschillende chemische methoden: hydrazinolyse en bèta-eliminatie om een goede complete analyse mogelijk te maken. Vervolgens zijn de glycanen geanalyseerd met behulp van MALDI-TOF MS, LC-MS en aanvullende karakterisatietechnieken zoals 'linkage analysis'.

De glycanen van SEA-4D12 zijn zeer rijk aan fucoses ten opzichte van de glycanen van 'gewoon SEA'. Tijdens de hydrazinolyse is door onbekende oorzaak in hoge mate degradatie opgetreden waardoor veel kleinere, lineaire structuren ontstonden met een galactose aan het reducerende eind, die ten behoeve van zowel zuivering als detectie met het fluorescente 2AB werden gelabeld. Deze 2AB-gelabelde kleine glycanen bleken uiteindelijk zeer waardevol voor het bepalen van de exacte glyco-epitop van mAb 114-4D12. Op de pool van 2AB-gelabelde SEA-4D12 glycanen werd 114-4D12 affiniteitschromatografie toegepast. Alleen de epitop-bevattende glycanen (H1N2F4 en H1N3F6) werden door het antilichaam gebonden en konden zo van de andere glycanen gescheiden worden. Op deze manier werd de glyco-epitop van diagnostisch mAb 114-4D12 geïdentificeerd als $\text{Fu}\alpha 1\text{-2Fu}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4(Fu}\alpha 1\text{-2Fu}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}\beta 1\text{-}$. De oorspronkelijke O-glycanen die deze epitop bevatten bleken voornamelijk vertakte structuren gebaseerd op een $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-6(Gal}\beta 1\text{-3)GalNAc}$ -type 2 'core-structuur' met composities $\text{H}_1\text{N}_{3-8}\text{F}_{4-12}$.

Omdat uit de hierboven beschreven studie bleek dat mAb 114-4D12 de eigenschappen bezit om een monovalent gepresenteerde epitoot te binden, werd besloten om op een urinepool van mensen die met *S. mansoni*-geïnfecteerd waren, 114-4D12-affiniteitszuivering toe te passen en het eluaat te bestuderen op epitoot-bevattende structuren met behulp van MALDI-TOF MS. De resultaten hiervan worden beschreven in **hoofdstuk 4**. Tot onze verbazing werd een MALDI-TOF MS spectrum gegenereerd met een scherp piekenpatroon, waarvan de vermeende composities duiden op een serie vrije glycanen bestaande uit een hexose (H), drie tot zeven N-acetylhexosamines (N) en vier tot tien fucoses (F) ($H_1N_{3-7}F_{4-10}$). De reducerende glycanen werden 2AB-gelabeld, gezuiverd en verder geanalyseerd met behulp van LC-MS. De vraag of deze vrije glycanen afkomstig zijn van de parasiet werd beantwoord door zowel *S. mansoni* eieren als wormen te incuberen in medium en het supernatant ook met behulp van 114-4D12 affiniteitschromatografie te zuiveren. De *S. mansoni* eieren bleken de vrije glycanen uit te scheiden, de wormen niet. Naast de serie vrije glycanen die zichtbaar was in urine werd in het supernatant van eieren nog een serie gefucosyleerde glycanen gedetecteerd met compositie: $N_{4-6}F_{4-10}$.

Het is voor zover wij weten voor het eerst dat is beschreven dat een parasiet vrije glycanen produceert. Hoe de synthese hiervan verloopt is vooralsnog onduidelijk. Ook weten wij niet of naast deze gefucosyleerde structuren nog andere vrije glycanen met minder of zonder fucoses worden geproduceerd.

Mogelijk zouden de in dit proefschrift beschreven ei-gesecreteerde glycanen kunnen worden gebruikt als *S. mansoni* infectiemarkers. Om dat te onderzoeken is in **hoofdstuk 5** de 114-4D12 affiniteitszuiveringmethode toegepast op 11 urines (1ml) van *S. mansoni* geïnfecteerde personen uit Senegal bij wie de intensiteit van infectie varieerde. Omdat de ontwikkelde methode zeer arbeidsintensief was, konden helaas geen grote aantallen urines op deze manier worden getest. In negen van de elf positieve urines werden de vrije glycanen met MALDI-TOF MS gedetecteerd. De negen geteste urines van niet geïnfecteerde personen uit Burundi vertoonden geen pieken in MALDI-TOF MS.

Omdat de vrije glycanen van eieren afkomstig zijn, zouden deze structuren kunnen worden gezien als 'ei-last' gerelateerde infectiemarkers terwijl ze tevens, omdat de granuloomvorming rond de achtergebleven eieren in de weefsels (met name lever en darm) de voornaamste oorzaak is van de pathologie van de ziekte, potentieel hebben als morbidity markers. Bovendien is er een steeds grotere behoefte aan een zeer gevoelige en specifieke methode om mensen met een lichte Schistosoma-infectie te kunnen diagnosticeren. Door het stijgend aantal reizigers naar verre bestemmingen komen steeds meer mensen thuis met een

lichte *Schistosoma*-infectie en door succesvolle grootschalige behandelprogramma's daalt de intensiteit van infecties van de lokale bevolking. Het zou daarom zeer de moeite waard zijn om te kijken of het mogelijk is op basis van de vrije ei-glycanen een diagnostische methode te ontwikkelen die zeer gevoelig is en minder arbeidsintensief dan de methode zoals beschreven in hoofdstuk 5 zodat grote aantallen urines zouden kunnen worden getest.

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) is een glycoproteïne van de mollusk *Megathura crenulata* dat een glycomotief deelt met *S. mansoni*. Op basis van deze kruisreactiviteit kan KLH worden gebruikt om de aanwezigheid van anti-*Schistosoma mansoni* antilichamen aan te tonen in serum van patiënten ten behoeve van diagnose. De immunogene KLH glycanen zijn net als glycanen van *S. mansoni* in staat granuloma te induceren en worden naast het gebruik voor diagnose van schistosomiasis voor verschillende medische toepassingen gebruikt. In hoofdstuk 2 hebben we laten zien dat de kruisreactieve glyco-epitop terminaal F-LDN-F is, en dat dit motief voorkomt op ei-gesecreteerde glycoproteïnen en glycolipiden in en rond "kanalen" in het parenchym van volwassen wormen. **Hoofdstuk 6** beschrijft de karakterisatie van de N-glycanen van KLH en de identificatie van een nieuwe 'core'-modificatie: (Galβ1-4)_nGalβ1-4Fucα1-6 op de reducerende N-acetylglucosamine. Deze modificatie komt niet voor op *S. mansoni* N-glycanen.

Dit proefschrift wordt afgesloten met een algemene discussie, **hoofdstuk 7**. Daarin worden verbanden gelegd tussen de hoofdstukken en worden een aantal andere facetten van het onderzoek besproken waar in de individuele hoofdstukken geen ruimte voor was. De gerelateerde monoklonale antilichamen 114-4D12 en 114-5B1 worden onderling vergeleken en de 114-4D12 epitop karakterisatie op basis van natuurlijke glycanen wordt vergeleken met de 114-5B1 epitop karakterisatie op basis van synthetische suikerstructuren. De resultaten en beperkingen van initiële proteomics analyses aan de 114-4D12 gezuiverde ei-antigenen worden gepresenteerd. Tot slot worden suggesties gegeven voor toekomstig onderzoek.