



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Rapid and sensitive methods for the analysis and identification of O-glycans from glycoproteins

Kozak, R.P.

Citation

Kozak, R. P. (2017, January 24). *Rapid and sensitive methods for the analysis and identification of O-glycans from glycoproteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45434>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45434>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45434> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kozak, R.P.

Title: Rapid and sensitive methods for the analysis and identification of O-glycans from glycoproteins

Issue Date: 2017-01-24

Dutch summary

Eiwitglycosylering is een veel voorkomende post-translationele modificatie die resulteert in de vorming van zogenaamde glycoproteïnen. Bij de twee meest voorkomende typen, O- en N-glycosylering, worden zowel relatief eenvoudige als complexe glycaanstructuren aangetroffen. Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven richt zich op O-glycosylering. O-glycanen spelen o.a. een belangrijke rol in het afweersysteem, migratie van witte bloedcellen in het lichaam en de aanmaak en functie van lymfe- en bloedvaten. Daarnaast beschermen O-glycanen van mucines op darmepitheelcellen tegen microflora en extreme pH en hebben ze een beschermende werking bij het ontstaan van tumoren.

In studies waarbij de eiwitglycosylering van zowel zieke als gezonde mensen werd onderzocht is gebleken dat veranderingen in eiwitglycosylering gecorreleerd zijn met verschillende (stadia van) ziekten. Hiermee hebben glycosyleringprofielen dus wellicht prognostische en diagnostische waarde en kunnen bepaalde glycaanstructuren zelfs mogelijk als biomarker worden gebruikt. Een voorbeeld van een succesvolle classificatie op basis van O-glycaan profielen is beschreven voor borstkanker. Daarnaast zijn verkorte O-glycanen in een specifieke structuur van het immunoglobuline A (IgA), de zogenaamde hinge region, in verband gebracht met een bepaalde vorm van nierontsteking (IgA nefropathie). Meer onderzoek is echter noodzakelijk teneinde vast te stellen welke O-glycaan structuren correleren met progressie van een ziekte. Deze kennis is essentieel voor de verdere ontwikkeling van diagnostische en therapeutische strategieën.

De afgelopen 10 jaar is het aantal goedgekeurde eiwitgeneesmiddelen, zogenaamde biologicals, snel gegroeid, wat heeft geresulteerd in een totale marktwaarde van

\$140 miljard. Dat is ongeveer 20% van de totale markt van alle geneesmiddelen. Onder biologicals vallen (recombinante) eiwitten zoals cytokines, monoclonale antilichamen, vaccins, hormonen groeifactoren en bloedfactoren. Meer dan tweederde van deze biologicals zijn glycoproteïnen, en de glycanen op deze eiwitten zijn belangrijk voor de werkzaamheid, maar ook veiligheid, van deze geneesmiddelen. De FDA richtlijnen schrijven hierover: “Glycaanstructuren dienen gekarakteriseerd te worden, en speciale aandacht dient te worden gegeven aan de mate van mannosylering, galactosylering, fucosylering en sialylering. De verdeling van de belangrijkste glycaanstructuren dient te worden bepaald.”

Voor zowel de studies naar O-glycosyleringsprofielen bij ziekteprocessen als de karakterisering van O-glycanen op biologicals is de ontwikkeling van methoden en technieken die de (grootschalige) analyse van O-glycanen mogelijk maakt onontbeerlijk. Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is de ontwikkeling en verbetering van zulke methoden.

De laatste 10 jaar zijn er verschillende technieken ontwikkeld voor de analyse van O-glycanen. Hiervoor is het als eerste belangrijk om de O-glycanen los in handen te krijgen. Echter, het verbreken van de verbinding tussen de O-glycanen en de eiwitten waaraan ze gekoppeld zitten, blijft een lastige klus (Hoofdstuk 2). De belangrijkste reden hiervoor is dat er geen universeel enzym beschikbaar is dat alle O-glycanen van eiwitten kan vrijmaken. De commercieel verkrijgbare O-glycanases, endo- α -N-acetylgalactosamidases, hebben een hoge specificiteit die zich beperkt tot zogenaamde neutrale core-1 O-glycanen (Gal β 1-3GalNAc). Om die reden wordt er vaak voor een chemische reactie voor het vrijmaken van de O-glycanen gekozen. Hiervoor zijn verschillende methoden beschreven en de bekendste hiervan is β -

eliminatie. Deze strategie resulteert in O-glycanen in de gereduceerde vorm (alditol). Het nadeel van alditolen is dat deze niet aan het reducerende uiteinde gekoppeld kunnen worden met een fluorescent label waardoor de analyse van alditolen beperkt blijft tot massaspectrometrie (MS), anionenwisselingschromatografie met PAD (pulsed amperometric detection) of nucleaire resonantie spectroscopie (NMR). Om O-glycanen in een niet-reducerende vorm te verkrijgen zijn andere methoden beschikbaar. De meest geschikte voor het verkrijgen van een zo breed mogelijk spectrum van verschillende structuren met een hoge opbrengst is hydrazinolyse.

Helaas gaan de chemische methoden voor het losmaken van O-glycanen gepaard met nevenreacties, dit wordt peeling genoemd. Peeling is de stapsgewijze degradatie van een oligosacharide en begint bij het reducerende uiteinde. Het is een bekende nevenreactie die in veel gevallen heeft geresulteerd in een hoge mate van variatie in de O-glycaanprofielen die worden gemeten. Vanzelfsprekend is dit een groot probleem voor vergelijkende studies en kwaliteitscontrole en daarom is peeling door veel groepen bestudeerd. In de hoofdstukken 3 en 4 wordt de optimalisatie van methodes voor loskoppeling van O-glycanen met behulp van hydrazinolyse beschreven, met als doel de peeling zo laag mogelijk te houden. Wij vonden dat het toevoegen van 0.1% TFA of 100 mM EDTA, voorafgaand aan de hydrazinolyse, of toevoegen van EDTA aan hydrazine, resulteerde in een sterke reductie van de mate van peeling. Terwijl in de eerder gepubliceerde methodes peeling kon oplopen tot 70%, konden wij met onze strategie de hoeveelheid peeling terugbrengen tot 17-20%.

Eén van de meest gebruikte methodes voor glycaananalyse bestaat uit het labelen van het reducerende uiteinde van losgekoppelde glycanen met een fluorofoor via reductieve aminering. Structuren worden daarna gemonitord met behulp van HILIC-UHPLC en fluorescente detectie. Stoichiometrische koppeling van 1 label met elk glycaan maakt kwantificering van de verschillende structuren mogelijk. Fluorescente labels die worden gebruikt zijn 2-aminobenzamide (2-AB), 2-aminobenzoic acid (2-AA), 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid (APTS), 2-aminopyridine (AP), procaine, en procainamide. In Hoofdstuk 5 laten wij zien dat procainamide-gelabelde glycanen een betere fluorescente respons geven en een hogere intensiteit in positieve ESI-MS, in vergelijking tot het meer algemeen gebruikte 2-AB label. De procainamide-gelabelde glycanen zijn zowel geschikt voor (U)HPLC-FLR analyse, met goede chromatografische scheiding en dus kwantificering, en voor ESI-MS analyse, met hogere ionisatie efficiëntie en dus betere identificatie.

In Hoofdstuk 6 wordt O-glycosylering van humaan speeksel bestudeerd, gebruikmakend van de geoptimaliseerde methodes zoals beschreven in de hoofdstukken 3, 4 en 5. Humaan speeksel bevat een grote verscheidenheid aan verbindingen, inclusief glycoproteïnen, en vormt daarom een interessante bron van potentiële biomarkers. Wij vonden dat zowel de compositie als de hoeveelheid O-glycosylering in humane speekselmonsters varieerde gedurende de dag. Dit is belangrijke informatie voor elk vervolgonderzoek waar O-glycosylering van speeksel wordt bestudeerd, vooral als het daarbij om het identificeren van biomarkers gaat.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift wordt een algemene discussie gepresenteerd, waarbij de individuele hoofdstukken over de ontwikkeling en

optimalisering van verschillende technieken voor het bestuderen van eiwit O-glycosylering, in perspectief worden plaatst.

Het is onze overtuiging dat de hier gepresenteerde technologie kan worden ingezet voor de analyse van complexe biologische monsters en voor O-glycaan studies met als doel biomarkers te vinden. Wij verwachten ook dat deze verbeterde strategieën zullen worden toegepast in de farmaceutische industrie voor karakterisering van geneesmiddelen in zowel de vroege fase van ontwikkeling als aan het einde van de productielijn en na goedkeuring van de regelgevers, waarbij de kwaliteit continu gemonitord dient te blijven. De hier beschreven strategieën voor O-glycaan structuuranalyses kunnen dus een belangrijke bijdrage leveren bij de ontwikkeling van een biological, en de volledige aanvraag voor goedkeuring daarvan. Er is echter wel meer onderzoek vereist voor het ophelderen en begrijpen van biologische functies van O-glycosylering in het algemeen en de therapeutische werkzaamheid van bijvoorbeeld mucine-achtige O-glycosylering in het bijzonder.