



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Glycomics based biomarkers of the rate of aging : development and applications of high-throughput N-glycan analysis**

Ruhaak, L.R.

### **Citation**

Ruhaak, L. R. (2011, March 24). *Glycomics based biomarkers of the rate of aging : development and applications of high-throughput N-glycan analysis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16559>

Version: Corrected 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/1887/16559>

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

## **Wetenschappelijke samenvatting in het Nederlands.**

Glycosylering is de enzymatische koppeling van oligosacchariden (ook wel glycanen genoemd) aan eiwit- en vetstructuren. Meer dan 50% van de menselijke eiwitten zijn geglycosyleerd en correcte glycosylering is voor veel organismen van essentieel belang, aangezien glycanen belangrijke functies hebben in verschillende biologische processen zoals vouwing van eiwitten, uitscheiding van eiwitten, cel adhesie, receptor binding en activering van receptoren.

Aangezien glycanen vaak vertakte structuren zijn waarbij de monosacchariden op verschillende wijzen met elkaar gekoppeld kunnen zijn, kan eiwit glycosylering bijzonder divers zijn. Deze glycosylering is daarbij in een dynamisch evenwicht: wanneer een individu in een bepaalde fysiologische staat verkeert, is het glycaan-patroon bijzonder reproduceerbaar. Wanneer daarentegen de fysiologische status verandert, bijvoorbeeld door veroudering of ziekte, en derhalve het evenwicht verschuift, kan het glycaan-patroon extreme veranderingen ondergaan. Er zijn verschillende typen humane glycosylering beschreven; in alle studies behandeld in dit proefschrift worden N-glycanen bestudeerd, die gekenmerkt worden door de koppeling van het glycaan aan asparaginen binnen de eiwitstructuur.

Om het potentieel van glycosyleringspatronen als biomarkers te onderzoeken zou het bevorderlijk zijn wanneer materiaal op weefsel- of cellulair niveau bestudeerd kan worden, aangezien de meeste geglycosyleerde eiwitten daar functioneren. Zulk materiaal is echter moeilijk verkrijgbaar en daarom worden vaak lichaamsvloeistoffen, zoals bloed plasma of hersenvocht, waarvan veronderstelt wordt dat het de cellulaire processen reflecteert, onderzocht. Deze strategie wordt ook vaak binnen de proteomics en metabolomics velden gehanteerd.

De afgelopen jaren zijn verschillende strategieën ontwikkeld voor de analyse van N-glycanen. Een nadeel van deze methoden is echter dat ze matig geschikt zijn voor applicatie in high-throughput analyses. Methoden voor glycaan analyse kunnen gebaseerd zijn op intacte eiwit analyse, glycopeptide analyse of analyse van

afgesplitste glycanen. De strategieën voor high-throughput analyse beschreven in dit proefschrift zijn voornamelijk toegespitst op de analyse van afgesplitste glycanen, aangezien dit soort methoden breder toepasbaar is dan eiwit- of glycopeptide analyse. Toch is in een van de studies beschreven in dit proefschrift ook glycopeptide analyse toegepast. Het is hierbij mogelijk de bindingsplaats van het glycaan op het eiwit vast te stellen; deze strategie is echter moeilijk toepasbaar op complexe plasma monsters.

De eerste stap in N-glycaan analyse is meestal de enzymatische afsplitsing van de glycanen van de eiwitten. Glycanen kunnen voordat ze geanalyseerd worden gelabeld worden; dit verhoogt in principe ioniserings efficiëntie van de glycanen in massaspectrometrische analyses of introduceert en fluorescerende of UV-absorberende groep om detectie mogelijk te maken.

Het onderzoek naar veroudering zou gebaat zijn bij de ontwikkeling van markers voor langlevendheid, die de gezondheidsstatus van een individu reflecteren en gezonde veroudering voorspellen. Zulke markers, die de biologische leeftijd van een individu aangeven, zijn tot nu toe nauwelijks bekend. De Leiden Langleven Studie (LLS) is speciaal ontworpen om te zoeken naar biomarker die familiale langlevendheid reflecteren en gezonde veroudering voorspellen. Het cohort bestaat uit 420 buitengewoon langlevende families en naast de langlevende broers en zussen (n=960), zijn ook hun kinderen (n=1710) en de partners van de kinderen (n=761) in het cohort opgenomen, om case-controlle studies mogelijk te maken. De opzet van de studie is geïllustreerd in Figuur 1-9.

Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift is te zoeken naar veranderingen in eiwit glycosylering die associëren met familiale langlevendheid in de Leiden Langlevendheid Studie. De LLS bestaat uit meerdere duizenden monsters en daarom was er behoefte aan high-throughput analyse technieken, die het mogelijk maken op grote schaal glycaan analyses uit te voeren. De ontwikkeling van dit soort technieken – in het bijzonder toegespitst op monstervoorbewerking – die ook toe-

pasbaar zijn op andere grootschalige klinische cohorten was dan ook een essentieel onderdeel van de studies beschreven in dit proefschrift.

### **Onderzoek beschreven in dit proefschrift**

In hoofdstuk 2 wordt een high-throughput procedure voor het bereiden van 2-aminobenzoezuur (2AA) gelabelde N-glycanen uit humaan plasma op het 96-well plaat niveau beschreven. In deze methode worden N-glycanen afgesplitst van de eiwitten en daarna gelabeld met 2-AA zonder tussentijdse zuivering stap. Een op HILIC gebaseerde vaste fase extractie (SPE) wordt dan toegepast om de 2-AA gelabelde oligosacchariden te isoleren. De suikers kunnen dan geanalyseerd worden met behulp van MALDI-TOF-MS, HPLC met fluorescentie detectie en CE-MS. Er kunnen maximaal vier 96-wells platen met humane samples tegelijk worden opgewerkt; de hoge throughput in combinatie met de grote veelzijdigheid van het label maakt deze procedure bijzonder aantrekkelijk voor glycomics analyses van grote hoeveelheden klinische plasma samples.

Meestal worden N-glycanen gelabeld door middel van reductieve aminering met een fluorofoor dat een primair amine bevat (deze methode is ook gebruikt in Hoofdstuk 2). Tijdens de reductieve aminering reageert de amine van het label met de aldehyde van het N-glycaan tot een Schiff-base, die vervolgens gereduceerd wordt tot een secundair amine. Om de Schiff-base te reduceren wordt een reductiemiddel gebruikt. Binnen de glyco-analyse wordt bijna alleen natrium cyanoborohydride gebruikt als reductiemiddel; een belangrijk nadeel van het gebruik van deze stof is echter dat tijdens de reactie het giftige blauwzuurgas ontstaat. In hoofdstuk 3 wordt het gebruik van een 2-picoline borane als alternatief reductiemiddel voor de labeling van N-glycanen beschreven. 2-picoline borane heeft geen giftige bij-producten.

In hoofdstuk 2 werd de analyse van N-glycanen met hulp van HPLC-FLU beschreven, Ondanks dat deze analyse methode effectief is, is de methode niet erg efficiënt (ongeveer 96 samples kunnen worden geanalyseerd per week). Daarom bestond behoefte aan aanvullende, op scheiding gebaseerde technieken voor kwantitatieve

analyse. In hoofdstuk 4 wordt een geoptimaliseerde monstervoorbewerking beschreven voor de analyse van N-glycanen met behulp van multiplexed capillaire gel electroforese met laser geïnduceerde fluorescentie detectie (CGE-LIF). Het gebruik van deze analyse methode faciliteert high-throughput analyse, waarbij 96 monsters in 2,5 uur gemeten kunnen worden. Tijdens de monstervoorbewerking worden glycanen enzymatisch afgesplitst, waarna ze met behulp van 2-picoline borane gelabeld worden met APTS. De reactiecondities werden zo geoptimaliseerd dat een hoge labeling efficiëntie, korte bewerkingstijd en gelimiteerde afbraak van sialzuur wordt gerealiseerd. De monsters worden gezuiverd met behulp van hydrofiele interactie chromatografie (HILIC) vaste fase extractie op 96-wells niveau en daarna geanalyseerd met CGE-LIF in een 48-kanaals DNA sequencer. Ondanks dat de monstervoorbewerking twee lange incubatie stappen bevat, kunnen 96 samples worden geanalyseerd met een totale effectieve werktijd van 2,5 uur.

Het tweede deel van het proefschrift behelst voornamelijk applicaties van de eerder beschreven methoden op de Leiden Langleven Studie.

Om te onderzoeken of glycanen afgesplitst van alle eiwitten in plasma als marker kunnen dienen voor familiale langlevendheid en of zij gezonde van ongezonde veroudering kunnen onderscheiden in de LLS, wordt in hoofdstuk 5 de methode zoals beschreven in hoofdstuk 2 –met 2-AA labeling en HILIC-HPLC-FL analyse- toegepast op plasma monsters van de LLS. In de kinderen uit de langlevende families konden hogere waarden van twee signalen uit de analyse (LC- en LC-8) worden gedetecteerd dan in hun partners. Ook wanneer rekening gehouden wordt met het veranderde lipiden-profiel en de veranderde glyucose-huishouding blijft deze bevinding staan. Omdat LC-7 en LC-8 ook geassocieerd konden worden met CRP-niveaus, zou het kunnen dat plasma glycosylering ook een de gezondheids-status binnen het cohort kan reflecteren. Dit wordt bevestigd door de bevinding dat LC-8 verlaagd is in mensen die een hartaanval gehad hebben. Plasma N-glycosyleringspatronen markeren dus niet alleen familiale langlevendheid, maar reflecteren ook gezonde veroudering. Om deze resultaten te bevestigen is verder onderzoek noodzakelijk.

In hoofdstuk 5 worden glycanen geanalyseerd van de totale plasma eiwit pool. Omdat dit echter ook nadelen heeft (het is bijvoorbeeld niet bekend of veranderingen in glycosyleringspatronen door veranderingen in glycosylering of door veranderingen in eiwit concentraties veroorzaakt worden) zijn de hoofdstukken 6 en 7 toegespitst op de N-glycaan analyse van specifieke eiwitten. Eerdere studies hebben aangetoond dat de glycosylering van immunoglobuline G (IgG) verandert naarmate men ouder wordt. In hoofdstuk 6 wordt bestudeerd of de glycosylering van IgG ook een reflectie kan zijn voor de vroege kenmerken van langlevendheid. Van 1967 deelnemers in de LLS werden subklasse specifieke IgG glycosyleringspatronen gemeten middels MALDI-TOF-MS analyse van de tryptische IgG-Fc glycopeptiden. Het kon –ook in deze grootschalige studie- worden bevestigd dat het niveau van galactosylering lager wordt met veroudering. Daarnaast blijkt dat de aanwezigheid van een bisecting GlcNAc op volledig gegalactosyleerde structuren vaker voorkomt naarmate men ouder wordt. In jongere deelnemers (onder 60 jaar), maar niet in oudere deelnemers (boven 60 jaar) indiceren verlaagde waarden van de niet- of mono-gegalactosyleerde structuren met een bisecting GlcNAc vroege kenmerken van langlevendheid. Het kan dus worden geconcludeerd dat het IgG glycosyleringspatroon op alle leeftijden (tussen 30 en 80 jaar) kalenderleeftijd reflecteert, en op jongere leeftijd (tussen 30 en 60 jaar) mogelijkheid langlevend te worden indiceert.

Het op grote schaal aanwenden van immuno-affiniteits zuivering in combinatie met high-throughput N-glycaan analyse ten behoeve van doelgerichte biomarker ontwikkeling wordt beschreven in hoofdstuk 7. Alfa-1-antitrypsine (AAT) en immunoglobuline A (IgA) werden uit plasma gezuiverd op 96-wells niveau met behulp van met antilichaam omhulde bolletjes. Deze methode werd toegepast op 2395 plasma monsters uit de LLS. De N-glycosyleringspatronen van AAT reflecteren kalender leeftijd en verschillen bovendien tussen mannen en vrouwen. Bovendien blijken verschillende karakteristieken van AAT glycosylering geassocieerd te zijn met fysiologische parameters die cardiovasculaire en metabole ziekten reflecteren. Twee glycanen –beiden zonder fucose- zijn positief gerelateerd aan het optreden van een hartinfarct. Verschillende biologische en fysiologische parameters kunnen dus aan AAT-

glycosyleringskenmerken gerelateerd worden. De glycosyleringspatronen van IgA blijken, daarentegen, niet beïnvloed te worden.

## **Conclusies**

Als het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (hoofdstuk 8) is een algemene discussie opgenomen, die de verschillende individuele hoofdstukken in hun context plaatst. Verschillende veranderingen in N-glycosyleringspatronen konden in dit proefschrift in verband gebracht worden met familiale langlevendheid. In hoofdstuk 5 werden twee signalen van het totaal plasma N-glycaan patroon geassocieerd met langlevendheid, en drie niet- of mono- gegalactosyleerde IgG glycopeptiden werden in hoofdstuk 6 in verband gebracht met familiale langlevendheid. Ook wanneer rekening gehouden wordt met het veranderde lipiden-profiel en de veranderde glycosyl-huishouding blijven deze bevindingen overeind en de N-glycaan patronen mogen dus beschouwd worden als nieuwe kenmerken van familiale langlevendheid. De voorspellende waarde van de N-glycaan patronen zijn helaas echter –net als van de glucose-huishouding en van het lipiden-profiel- niet groot. Het moet dan ook geconcludeerd worden dat er meerdere markers nodig zijn voor de voorspelling van complexe fenotypen als familiale langlevendheid.

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling besproken van verschillende strategieën voor de high-throughput analyse van N-glycanen, zowel op het niveau van totaal plasma als ook op het niveau van individuele eiwitten. De ontwikkelde technieken zijn dan toegepast op een cohort van een biomedische studie van grote omvang, zoals dat gebruikelijk is voor dat soort studies; bij het bestuderen van dit cohort was de high-throughput noodzakelijk en is het potentieel van de methoden gebleken. Het is dan ook waarschijnlijk dat de ontwikkelde strategieën van grote waarde zullen zijn in andere onderdelen van het biomedische onderzoek.