



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Glycoproteomics characterization of immunoglobulins in health and disease

Plomp, H.R.

Citation

Plomp, H. R. (2017, May 31). *Glycoproteomics characterization of immunoglobulins in health and disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/49752>

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/1887/49752>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/49752> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Plomp, H.R.

Title: Glycoproteomics characterization of immunoglobulins in health and disease

Issue Date: 2017-05-31

Samenvatting (Nederlands)

De glycosylering van immunoglobulinen (Ig) lijkt een belangrijke rol te spelen bij de regulering van het immuunsysteem. Van glycosylering van IgG is aangetoond dat het invloed heeft op de functionele werking, en glycosylering van IgE is essentieel voor binding aan receptoren. Daarnaast zijn verscheidene ziekten geassocieerd met afwijkende Ig glycosyleringsprofielen – onder andere lage galactosylering en sialylering van IgG *N*-glycanen bij auto-immuunziekten, en lage galactosylering van IgA *O*-glycanen bij IgA nefropathie.

Glycanen kunnen meerdere posities bezetten op immunoglobulinen: elke zware keten draagt ten minste één *N*-glycaan, welke invloed kan uitoefenen op de binding met receptoren; het scharniergebied van verschillende Ig klassen kan bedekt zijn met *O*-glycanen; en tenslotte kan de variabele sequentie van het Fab gedeelte eveneens glycanen bevatten. Om onderscheid te maken tussen glycanen op verschillende posities kan gebruik gemaakt worden van glycoproteomics methoden om een site-specifiek glycosyleringsprofiel te bepalen. Proteolytisch-gegenereerde glycopeptiden kunnen met LC-MS/MS worden geanalyseerd, wat zowel een relatief hoge high throughput als een goed overzicht van de composities van de glycanen verschaft.

In dit proefschrift zijn glycoproteomics methoden op basis van massa spectrometrie gebruikt om de glycosylering van verschillende immunoglobulinen te karakteriseren. Hoewel het terrein van glycomics zich in rap tempo uitbreidt, zijn studies op het gebied van glycosylering van antilichamen tot nu toe bijna geheel op IgG gefocust. Dit kan deels worden toegeschreven aan de hoge concentratie van IgG in bloed en de lage complexiteit van de bijbehorende glycosylering, wat de analyse relatief eenvoudig maakt. De glycosylering van andere Ig klassen is voor het overgrote deel onontgonnen gebied, met name voor de immunoglobulinen met een lage concentratie zoals IgD en IgE.

Structurele analyse van Ig glycosylering

Immunoglobuline E vertoont de laagste concentratie van alle immunoglobulinen in het bloed, maar bezit tegelijkertijd de capaciteit om de sterkste immuunreacties te ontlokken. IgE is betrokken bij de bescherming tegen parasieten, maar staat vooral bekend als de oorzaak van allergische reacties. De eiwitsequentie van IgE bevat zeven potentiële *N*-glycosyleringsites, maar in de literatuur was geen duidelijke consensus omtrent de vraag of deze allen bezet waren. In **Hoofdstuk 2** beschrijven wij de ontwikkeling van een glycoproteomics methode

om de glycosylering van IgE te analyseren: IgE is gedigesteerd met drie verschillende proteases, en de resulterende glycopeptiden zijn geïdentificeerd met behulp van LC-MS/MS. Hiermee konden we laten zien dat zes van de zeven potentiële *N*-glycosyleringssites bezet waren en hebben we een site-specifiek overzicht gepresenteerd van de *N*-glycanen die op elke site aanwezig zijn. Wij laten daarnaast zien dat IgE afkomstig van myeloma patiënten afwijkende glycosylering vertoonde – met name een hoger niveau van tri- en tetra-antennaire glycanen en minder bisecting GlcNAc – terwijl dit bij IgE van een hyperimmuun donor niet het geval was, al moet gezegd worden dat beide observaties op slechts één enkel monster gebaseerd waren. Sindsdien is aangetoond dat één van de IgE glycanen essentieel is voor de binding met de hoge-affiniteitsreceptor FcεRI.

In **Hoofdstuk 3** rapporteerden wij gedeeltelijke *O*-glycosylering van IgG3. Uniek aan IgG3 vergeleken met de andere IgG subklassen is het verlengde scharniergebied dat een drievoudige herhalende sequentie bevat. Uit LC-MS(/MS) analyses van tryptische glycopeptiden konden wij opmaken dat deze sequentie tot drie sites van *O*-glycosylering kan bevatten, met voornamelijk mono- en di-gesialyleerde core 1-type *O*-glycanen. Echter, slechts 10% van elke site wordt bezet door een glycaan en tussen zes individuen werd weinig variatie gevonden in zowel de bezetting als het soort *O*-glycanen. Men kan speculeren dat de *O*-glycanen betrokken zijn bij bescherming van IgG3 tegen bacteriële proteases, aangezien de *O*-glycanen digestie met endoproteïnase AspN belemmerden, en omdat van *O*-glycosylering in het scharniergebied van IgA1 en IgD ook is aangetoond dat het resistentie tegen proteases verleent.

Analyse van Ig glycosylering in populatie studies

Naast structurele analyse van glycosylering hebben wij ook de glycosylering van antilichamen in populatiecohorten gemeten. In **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5** is IgG Fc glycopeptide analyse uitgevoerd op bloedmonsters met gebruik van LC-MS. Wij vonden dat een laag gehalte van galactosylering en sialylering en een hoog gehalte van fucosylering geassocieerd waren met een staat van inflammatie.

In een cohort van 76 ANCA vasculitis patiënten was lage galactosylering en sialylering van IgG geassocieerd met een hogere kans op een terugval in patiënten die op dat moment in remissie waren. In patiënten die een terugval hadden was het niveau van galactosylering, sialylering, en bisecting GlcNAc van IgG significant afgenomen, terwijl dat in patiënten die

in remissie bleven niet het geval was. Interessant genoeg was PR3-specifiek IgG geen betere voorspeller van een terugval dan de totale pool van IgG, alhoewel het dezelfde trends vertoonde.

In de circa 1800 participanten van de Leiden Longevity studie (LLS) zagen we dat lage galactosylering en sialylering van IgG samen met hoge fucosylering associatie vertoonde met markers van inflammatie. Lage galactosylering en sialylering waren ook geassocieerd met een laag gehalte van hoge-dichtheid lipoproteïne cholesterol (HDL) en een hoog gehalte van triglyceriden, waarvan bekend is dat het risicofactoren zijn voor cardiovasculaire ziekten. Dit tezamen indiceert een potentiële rol voor IgG glycosylering als een biomarker van inflammatie en metabole gezondheid. Dit wordt echter bemoeilijkt door de substantiële interindividuele verschillen.

Interessant genoeg toonde galactosylering en sialylering van IgG2 een consistent zwakkere associatie met metabole markers in vergelijking met de andere IgG subklassen. Dit kan duiden op een ondergeschikte rol van deze subklasse *in vivo*, wat ondersteund wordt door onderzoek naar *in vitro* receptor binding in de literatuur. Daarenboven vonden wij dat, in zowel het LLS als het ANCA vasculitis cohort na correctie voor galactosylering, IgG sialylering niet langer associatie vertoonde met metabole markers, noch als voorspeller voor een ANCA vasculitis relapse. Dit pleit voor de theorie dat voornamelijk galactosylering, en niet sialylering, invloed heeft op de inflammatoire capaciteit van humaan IgG. Tenslotte zagen we dat participanten met een latente cytomegalovirus infectie een lager gehalte aan fucosylering vertoonden, terwijl huidige rokers een hoger niveau van bisecting GlcNAc in hun IgG hadden.

Conclusie en toekomstperspectief

Wij hopen dat de nieuwe data die in dit proefschrift wordt gepresenteerd bijdraagt aan de opheldering van de rol van glycosylering van antilichamen in het immuunsysteem, waarvan het huidige begrip nog zeer gelimiteerd is. In het algemeen wijst ons onderzoek aan dat de glycosylering van IgG van waarde kan zijn als biomarker van inflammatie en metabole gezondheid, maar de biologische mechanismen die achter dit voorstel schuilen zijn nog niet duidelijk. Functionele studies hebben een tipje van de sluier opgelicht wat betreft de rol van IgG glycosylering bij binding aan receptoren en andere immuunreacties, maar tegelijkertijd botst deze data vaak met resultaten van *in vivo* onderzoek. Diepgaand functioneel onderzoek

naar de rol van IgG glycosylering zijn daarom nodig, met modellen die zo dicht mogelijk de humane fysiologie nabootsen, evenals functionele studies naar de glycosylering van andere immunoglobulinen, die tot op heden schaars zijn.

De sensitiviteit van huidige (LC-MS) technieken neemt in rap tempo toe en wij hopen dat dit de gelegenheid geeft tot onderzoek naar immunoglobulinen zoals IgE en IgD, waarvan de lage concentratie in bloed nu een obstakel is. Daarnaast zijn de laatste jaren nieuwe software tools ontwikkeld om de analyse van massa spectrometrische glycosyleringsdata te faciliteren, die van grote waarde zullen zijn voor de analyse van antilichamen met een groot aantal glycosyleringssites, zoals IgE en IgM. Wij verwachten daarom dat high-throughput analyse van de glycosylering van alle immunoglobulinen binnenkort binnen bereik zal zijn.

